

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Versuche zur Etablierung eines Verfahrens zur Isolierung von RNA aus Eberspermien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Lika Savchuk
aus
Dshambul

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität München

Dekan: Univ. – Prof. Dr. Erwin P. Märtlbauer

Referent: Univ. – Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Univ. – Prof. Dr. Joahim Braun

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1. SPERMATOGENESE	3
2.1.1. SPERMATOZYGOTENGESE	3
2.1.2. MEIOSE	3
2.1.3. SPERMIOGENESE	4
2.1.4. SPERMINATION	5
2.1.5. ÜBERGANG DER SPERMIIEN IN DIE NEBENHODEN, REIFUNG UND SPEICHERUNG	5
2.2. REGULATION DER GENEXPRESSIION	6
2.3. MESSENGER RIBONUKLEOPROTEIN PARTIKEL (RNP)	9
2.4. POSTMEIOTISCHE TRANSKRIPTION	10
2.5. MITOCHONDRIEN	12
2.6. INTERZELLULÄRE BRÜCKEN	12
2.7. RNA MOLEKÜLE IN SPERMIIEN UND SOMATISCHEN ZELLEN IM VERGLEICH	14
2.8. HISTONGBUNDENE FRAGMENTE IN SPERMIIEN DNA	15
2.9. ROLLE DER RNAs IN DER STRUKTURELLEN UND FUNKTIONELLEN ORGANISATION DER SPERMIIENKERN DNA	16
2.10. RNA: MÖGLICHE URSACHE FÜR UNFRUCHTBARKEIT	19
2.11. SPERMIIENTRANSKRIPTE WERDEN WÄHREND DER BEFRUCHTUNG IN DIE EIZELLE EINGESCHLEUST	21
2.12. ERZEUGUNG PARTHENOGENETISCHER NACHKOMMEN	22
2.13. KORRELATION ZWISCHEN SPERMIIENMOTILITÄT UND -TRANSKRIPTEN	23
2.14. ENTDECKUNG DER STABILEN SPERMIIEN RNA	24
2.15. RNA-ISOLIERUNG	25
2.15.1. KLASSISCHES PROTOKOLL ZUR GESAMT-RNA GEWINNUNG	25
2.15.2. PROTOKOLLE ZUR RNA-GEWINNUNG AUS SPERMIIEN	25
2.15.3. ANDERE RNA-ISOLIERUNGSMETHODEN	27
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1. MATERIAL	28
3.1.1. GERÄTE	28
3.1.2. GELELEKTROPHORESE-APPARATUREN	28
3.1.3. PCR GERÄTE	29
3.1.4. ZENTRIFUGEN	29
3.1.5. CHEMIKALIEN	29
3.1.6. REAGENZIEN UND ENZYME	30

3.1.7.	LÖSUNGEN	31
3.1.7.1	Medien, Lösungen und Puffer	31
3.1.7.2	Wasser	33
3.1.8.	SONSTIGE MATERIALIEN	33
3.1.9.	VERWENDETE SOFTWARE	33
3.1.10.	OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE QUANTITATIVE RT-PCR	34
3.1.11.	MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS FÜR DNA:	34
3.2.	METHODEN	34
3.2.1.	SPERMIENVORBEHANDLUNG	34
3.2.1.1	Waschung und Verdünnung der Spermien	35
3.2.2.	UMGANG MIT RNA-PROBEN	35
3.2.3.	ETABLIERUNG EINER RNA-ISOLATIONSMETHODE	36
3.2.4.	VORVERSUCHE	36
3.2.5.	ISOLATIONSMETHODEN	37
3.2.5.1	TriZol Protokoll	38
3.2.5.2	Douglas Protokoll	39
3.2.5.3	Hot-Phenol Protokoll	40
3.2.5.4	Miller Protokoll	41
3.2.5.5	RNA-Pure Protokoll	42
3.2.5.6	RNeasy Mini Kit	43
3.2.5.7	SDS-DTT-Proteinase K Vorbehandlung	43
3.2.6.	DURCHFÜHRUNG DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR	45
3.2.6.1	Dnase I Verdau	45
3.2.6.2	Reverse Transkription	45
3.2.6.3	Quantitative PCR	47
3.2.6.4	Primerdesign	49
3.2.6.5	Durchführung der qPCR	49
3.2.6.6	Agarosegelelektrophorese	51
4.	ERGEBNISSE	53
4.1.	ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE	53
4.2.	ERGEBNISSE DER HAUPTVERSUCHE	58
4.2.1.	TRIzol PROTOKOLL	58
4.2.2.	DOUGLAS PROTOKOLL	60
4.2.3.	HOT-PHENOL PROTOKOLL	62
4.2.4.	MILLER PROTOKOLL	64
4.2.5.	RNA-PURE PROTOKOLL	66
4.2.6.	RNEASY PROTOKOLL	68
4.2.7.	SDS-DTT-PROTEINASE K PROTOKOLL	70
4.2.8.	VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN METHODEN	72
5.	DISKUSSION	73
5.1.	ISOLATIONSMETHODEN	73
5.1.1.	WEITERGEHENDE RNA-UNTERSUCHUNGEN	77
5.1.2.	ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN REAL-TIME PCR	79
6.	ZUSAMMENFASSUNG	81

7.	SUMMARY	83
8.	LITERATURVERZEICHNIS	85
9.	DANKSAGUNG	92
10.	LEBENS LAUF	93

Abkürzungsverzeichnis

as	antisense Primer (Rückwärtsprimer)
bp	Basenpaare (Längenangabe für Nukleinsäuren)
cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence tag - Teilsequenzen einer cDNA
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVP	<i>in vitro</i> Produktion
M	mol/l
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	mmol/l
MM	Master Mix
mm	Millimeter
mW	Milliwatt
mRNA	messenger RNA
ncRNA	non coding RNA
ng	Nanogramm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pg	Picogramm
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein Partikel
rRNA	ribosomale RNA
se	sense Primer (Vorwärtsprimer)
Sek.	Sekunde
siRNA	short interfering RNA

SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
snRNA	small nuclear RNA
TBE	Tris Borsäure EDTA
tRNA	transfer RNA
U	unit
UV	ultraviolett
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm

Liste der zitierten Gene

Anmerkung:

Die in der Literatur angegebenen Genbezeichnungen stimmen nur noch teilweise mit den aktuellen Bezeichnungen überein. Es wurde die alten Namen den neuen angepasst und durch „früher bekannt als...“ kenntlich gemacht. Die aktuellen Genbezeichnungen wurden unter <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/> recherchiert.

<i>ACTB</i>	Beta-Aktin
<i>AKAP4</i>	A kinase anchor protein 4
<i>CREM</i>	cAMP responsive element Modulator
<i>CLGN</i>	Calmegin
<i>CLU</i>	Clusterin (früher bekannt als sulfatiertes Glykoprotein 2, SGP-2)
<i>CRISP2</i>	Cysteine-rich secretory protein 2 (früher bekannt als TPX1, testis-specific protein 1)
<i>CYC1</i>	Cytochrome c-1
<i>ENOS</i>	Endotheliale Stickoxid Synthetase
<i>FMR1</i>	Fragile X mental retardation 1
<i>FOXP1B</i>	Forkhead box G1B
<i>GAPDHS</i>	Spermien-spezifische Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
<i>HSPA4</i>	Heat shock 70kDa protein 4 (früher bekannt als HSP70)
<i>HSP90</i>	Heat shock 90kDa protein
<i>H19</i>	Imprinted maternally expressed untranslated mRNA
<i>IGF2</i>	Insulin-like growth factor 2
<i>LDHC</i>	Laktat dehydrogenase C
<i>MYC</i>	Myelocytomatosis viral oncogene homolog (früher bekannt als c-MYC)
<i>NOS2A</i>	Neuronale Stickoxid Synthetase (früher bekannt als nNOS)
<i>ODF2</i>	Outer dense fiber of sperm tails 2
<i>PABP</i>	Poly(A) binding protein

<i>PDHA1</i>	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1
<i>PDK1</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
<i>PRBP</i>	Protamin Binding Protein
<i>PRM1</i>	Protamin 1
<i>PRM2</i>	Protamin 2
<i>SRY</i>	Sex determining region Y
<i>TBP</i>	TATA box binding-protein
<i>TBRBP</i>	Testis/brain RNA binding Protein (früher bekannt als Translin)
<i>TNP1</i>	Transitionsprotein 1
<i>UBE1</i>	Ubiquitin-activating enzyme E1
<i>WNT5A</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
<i>XIST</i>	X (inactive)-specific transcript
<i>YBX1</i>	Y box binding Protein 1

1. Einleitung

Noch vor kurzem wurde eine Anwesenheit oder Funktion von RNA-Molekülen in Spermien angezweifelt, da die Spermien nur als Transporter für das väterliche Genom angesehen wurden. Neuere Untersuchungen zeigten hingegen die Existenz von RNAs in Spermien und vor allem die besondere Rolle dieser väterlichen RNA für die Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung.

In der Humanmedizin ist es durch Anwendung moderner Methoden möglich, ein Profil der Spermien-RNA normal fertiler Männer zu erstellen und neue Möglichkeiten zur Behandlung der iatrogenen Fertilitätsstörungen beim Mann ermöglichen. Die mRNAs in den ejakulierten Spermien liefern eine Aussage über den Verlauf der Spermatogenese und eine gestörte Spermatogenese würde sich in der Qualität und Quantität der RNA-Transkripte widerspiegeln.

In der Tierzucht beschränkt sich die Erfassung und Beurteilung der männlichen Fertilität vorrangig auf morphologische Eigenschaften ejakulierter Spermien (z. B. Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien, Spermienkonzentration, Aussehen des Ejakulats). Durch einen ergänzenden molekularbiologischen Parameter, wie ihn die Untersuchung der RNA-Transkripte darstellt, bestünde die Möglichkeit die charakteristischen Merkmale eines (hoch-)fruchtbaren Vartieres besser zu erfassen und zu interpretieren.

Neuere Untersuchungen an Spermien hinsichtlich der Funktion der RNA zeigen ein komplexes Zusammenspiel zwischen RNAs und optimaler Spermatogenese oder erfolgreicher Befruchtung. Zur Analyse dieser Funktionen und dem Erfassen fertilitätsbezogener Parameter auf RNA-Basis ist es wichtig, zuerst ein optimales RNA-Isolationsprotokoll zu etablieren, das eine hohe RNA-Ausbeute mit geringster Kontamination (u. a. mit genomischer DNA) und guter RNA-Qualität erlaubt.

In der Literatur sind keine Arbeiten beim Eber bekannt, die sich mit der Etablierung eines geeigneten Protokolls zur RNA-Isolierung aus Spermien befassen. Bei anderen Spezies (inklusive Mensch) existieren nur einige wenige Arbeiten.

Ziel der Arbeit ist es daher, eine optimale Methode für die RNA-Isolation aus Eberspermien zu etablieren. Dafür wurden sieben unterschiedliche Methoden untersucht, bei denen die Parameter RNA-Ausbeute (photometrische Messung, Gelelektrophorese), RNA-Reinheit und mögliche Kontaminationen (Gelelektrophorese, quantitative Real-Time PCR) erfasst wurden.

2. Literatur

2.1. Spermatogenese

Die Spermatogenese ist die Bildung der männlichen Gameten, der Spermien, die auch Spermatozoa oder Samenfäden genannt werden. Sie läuft nach der Pubertät als streng koordinierter Zellproliferations- und Differenzierungsprozess im Keimepithel der Hoden ab (Hees und Sinowatz, 1992). Ziel ist es, die gleichmäßige Produktion einer sehr großen Anzahl von männlichen Gameten sicherzustellen, die vor allem die Aufgabe haben, das männliche Genom zur befruchtungsbereiten Eizelle zu transportieren. Die Spermatogenese schreitet im Tubulusepithel von basal nach apikal fort, so dass die indifferenten Stammzellen, die Spermatogonien, ganz basal anzutreffen sind, die einzelnen Stadien der Meiose den mittleren Bereich des Keimepithels einnehmen und die fortgeschrittenen Differenzierungsstadien der Spermatiden und die Spermien lumenwärts liegen (Hees, Sinowatz, 1992). Die Spermatogenese lässt sich in drei Phasen unterteilen, die Spermatozytogenese, die Meiose und die Spermio-genese.

2.1.1. Spermatozytogenese

Die Phase umfasst die mitotische Vermehrung der Spermatogonien. Man unterscheidet auf Grund der Morphologie A- und B-Spermatogonien. Nach mitotischer Teilung der A-Spermatogonien bleibt die Hälfte von diesen als Stammzellen erhalten. Die anderen entwickeln sich zu den B-Spermatogonien, die nur wenig Kontakt mit der Basalmembran haben. Nach deren letzter mitotischer Teilung entstehen Spermatozyten I. Ordnung. Diese Zellen sind noch durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden. Alle Stadien sind diploid (aber 4C).

2.1.2. Meiose

Zuerst beginnt die Wachstumsperiode von Spermatozyten I. Ordnung. Danach kommt die I. Reifeteilung, die in mehrere Phasen unterteilt ist:

- a) langandauernde Prophase mit Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese,
- b) danach verlaufen sehr rasch Meta-, Ana- und Telophase. Es entstehen Spermatozyten II. Ordnung mit einem haploiden Chromosomensatz (2C) und einer 50:50 Verteilung der Geschlechtschromosomen.

Die Spermatozyten II. Ordnung existieren nur sehr kurz, da sie sehr rasch in die II. Reifeteilung eintreten. Das Ergebnis sind Spermatiden, die einen haploiden Chromosomensatz und einen DNA-Gehalt von $1n$ aufweisen. Diese Spermatiden sind kleine Zellen mit rundem Kern und in der Nähe des Tubuluslumens gelagert.

2.1.3. Spermiogenese

- Golgi-Phase (Beginn der Bildung von runden Spermatiden)

Glykoproteinhaltige Vesikel schnüren sich vom Golgi-Apparat ab und bilden die Kopfkappe. Proximale und distale Zentriolen wandern um den Kern herum (gegenüber vom Akrosom). Das proximale Zentriol ist eng mit dem Kern verbunden und bildet später den Spermienhals.

- Kappenphase

Die akrosomalen Granula verbreitern sich auf der Kernoberfläche solange bis $\frac{2}{3}$ des Kernes bedeckt wird. Aus dem distalen Zentriol entwickelt sich das Axonema, das deutlich aus dem Zytoplasma ragt. Das Axonema weist die typische $9 \times 2 + 2$ Struktur eines Ziliums auf.

- Akrosomphase (Beginn der Bildung von elongierten Spermatiden)

Diese Phase ist charakterisiert durch deutliche Veränderungen im Kern, im Akrosom und im Schwanz der Spermatiden. Die Veränderungen im Kern beinhalten die Verdichtung des Chromatins, die Verlängerung und die Abflachung seiner Form. In diesem Stadium werden die Histone durch Transitionsproteine ersetzt. Das Akrosom wird dem modifizierten Kern entsprechend angepasst. Diese Veränderungen verlaufen artspezifisch. Das Zytoplasma wird zum Schwanz hin verdrängt und bildet

eine ringförmige Struktur (Annulus). Die Mitochondrien ordnen sich spiralenförmig um das Axonema an und sind für das Mittelstück des Schwanzfadens charakteristisch.

- Reifungsphase

Die Transitionsproteine werden mittels der Transaminasen durch Protamine ersetzt, die eine noch stärkere Verdichtung des Chromatins um das 6-fache ermöglichen (Ward und Coffey; 1991). Die Fibrillen organisieren sich um das Axonema herum und ziehen sich vom Anfang bis zum Ende des Halses. Das Annulus zieht zu Mitte des Schwanzes. Die Zytoplasmareste bleiben als sogenannte residual bodies zurück. Die elongierten Spermatiden sind somit bereit in das Tubuluslumen als Spermatozoa frei gelassen zu werden.

2.1.4. Spermination

Die Abgabe der Keimzellen in das Lumen der samenleitenden Wege (Tubuli seminiferi) wird Spermination genannt. Die elongierten Spermatiden, die senkrecht zur Tubuluswand gerichtet sind, werden stufenweise in das Tubuluslumen verdrängt. Die Zytoplasmareste, die gruppenweise die Spermatiden mit interzellulären Brücken verbinden, verbleiben im Hodenepithel (Garner und Hafez, 2000).

2.1.5. Übergang der Spermien in die Nebenhoden, Reifung und Speicherung

Trotz einer morphologisch kompletten Ausstattung sind die Spermatozoen aus den Hoden noch nicht befruchtungsfähig. Sie sind nicht in der Lage, sich eigenständig zu bewegen oder die Zona pellucida der zu befruchtenden Eizelle zu durchdringen. Im Nebenhoden findet diese Reifung statt, daneben werden die Spermien dort gespeichert. Für die Reifung und den Transport im Nebenhoden werden ca. 10-14 Tage benötigt. Auf Grund dieser verhältnismäßig langen Zeit müssen die funktionellen Reifungsprozesse mit Vorgängen verbunden werden, die dem Schutz der Spermatozoen dienen. So findet z.B. im Verlauf der Nebenhodenpassage eine Stabilisierung von Schwanz- und Kernstrukturen durch Ausbildung von Disulfidbrücken statt. Vor allem wird die Plasmamembran der Spermien modifiziert. Dabei werden

Substanzen entfernt, die im Hoden absorbiert wurden, und Proteine oder Glykoproteine der Spermienmembran durch Enzyme des Nebenhodens (z. B. Proteasen, Glykosidasen und Glykosyltransferasen) modifiziert. Der Einbau von Cholesterin in die Spermienmembran trägt zu deren Stabilisierung bei (Engelhardt und Breves, 2000). Die meisten Spermien (ca. 70%) werden im Nebenhodenschwanz gespeichert. Nur 2% der Spermien befindet sich im Samenleiter und der Rest im Nebenhodenkopf. Nur die Spermien im distalen Nebenhodenschwanzteil können ejakuliert werden (Garner und Hafez, 2000).

2.2. Regulation der Genexpression

Wie oben beschrieben, werden die Histone durch Protamine ersetzt und führen so zur Kompaktierung der DNA und damit gleichzeitig zum Stillstand der Transkription. Jedoch wurden elektronenmikroskopisch in Humanspermien Vakuolen entdeckt, die Bereiche geringerer Dichte darstellen, die sogenannten „Transkriptionsblasen“ (Steger 1999). Diese Blasen können aber auch durch die humanspezifische Phosphorylierung des Protamins-2 (PRM2) stammen. Eine frühzeitige Chromatinkondensation führt zur Unfruchtbarkeit aufgrund des Stillstandes in der Spermiendifferenzierung (Steger 2001).

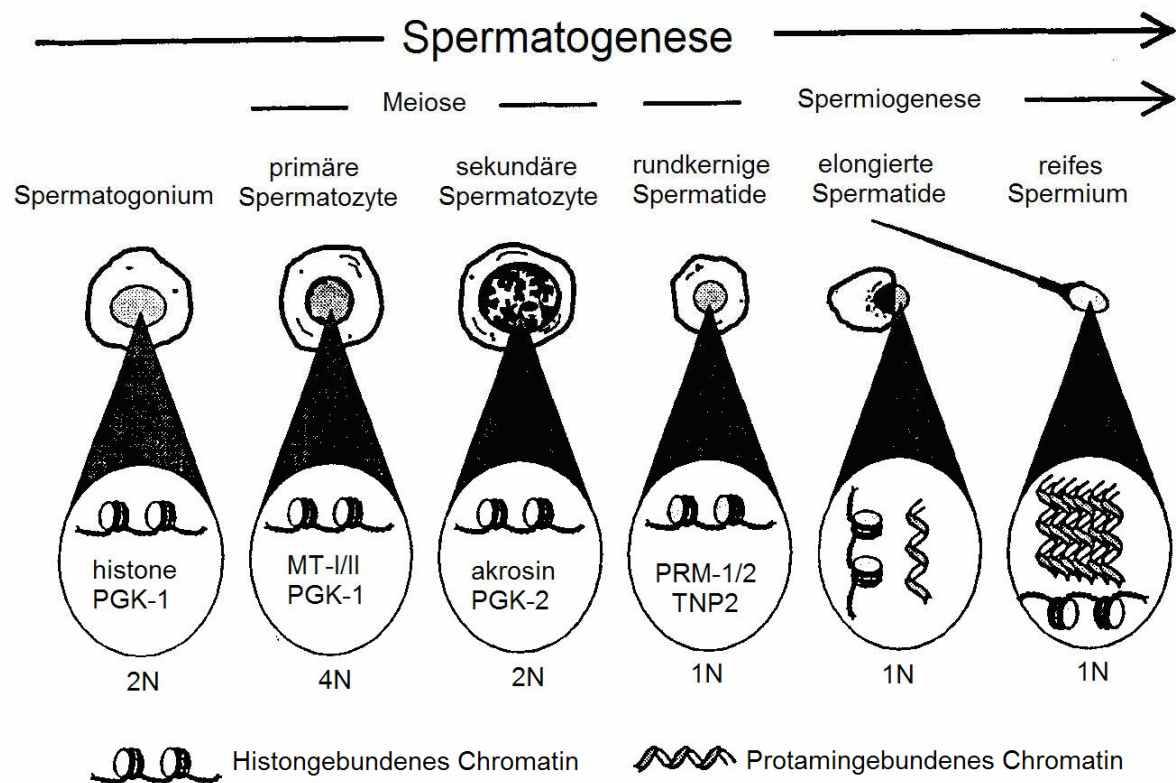


Abb. 1:

Stadien der Spermatogenese im Überblick (entnommen aus Miller, 2000)

Das Protamin Binding Protein (PRBP) wurde in runden und pachytenen Spermatiden beobachtet und gilt nach Steger (1999) wahrscheinlich als Hauptrepressor der Translation. Zu den Regulatoren der Genexpression zählen das Y-box-Protein (YBX1) und das testis/brain RNA binding Protein (TBRBP, beim Menschen Translin). Das YBX1-Protein fungiert als Transkriptionsfaktor und als Regler der Translationshemmung von gespeicherten Ribonukleoprotein Partikeln (RNP). Beim TBRBP wird eine Funktion beim Transport und der Speicherung von mRNAs zu bestimmten Plätzen in der Zelle vermutet, an denen die mRNAs auch translatiert werden (Morales et al., 2002).

Viele haploidexprimierte Gene beinhalten die Gene für die Transitionsproteine und die Protamine. Sie werden durch Bindung des cAMP-responsive element Modulator (CREM) zu den cAMP responsive box auf der cAMP-Promotor Region transkribiert.

Ein Fehlen des CREM-Gens führt zur Unfruchtbarkeit wegen der Verzögerung der Spermatogenese in den runden Spermatiden. Zirka 13% der Männer mit Azoospermie haben eine Mutation des CREM-Gens auf dem langen Arm des Y-Chromosoms (Steger 2001).

Die Genaktivität in Spermatiden hängt u.a. von der DNA Methylierung ab. Die TATA-Box ist in allen untersuchten Tierarten im Protaminingen enthalten und für den Beginn der Transkription durch das richtige Anlagern der Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion verantwortlich. Bei der Ratte korreliert ein hoher RNA-Gehalt in Spermien mit dem Vorhandensein von TATA-binding-protein (TBP) und RNA-Polymerase-II. In Spermatiden ist die *TBP* mRNA ca. 1.000-mal höher exprimiert als in normalen Körperzellen (Steger 2001). Außerdem wurde in geschlechtsreifen Hoden *TBP* mit zwei weiteren Exon-Sequenzen gefunden, die zum großen Teil in RNPs umgebaut werden. In juvenilen Hoden oder Körperzellen kommen die zwei zusätzlichen Exon-Sequenzen nicht vor.

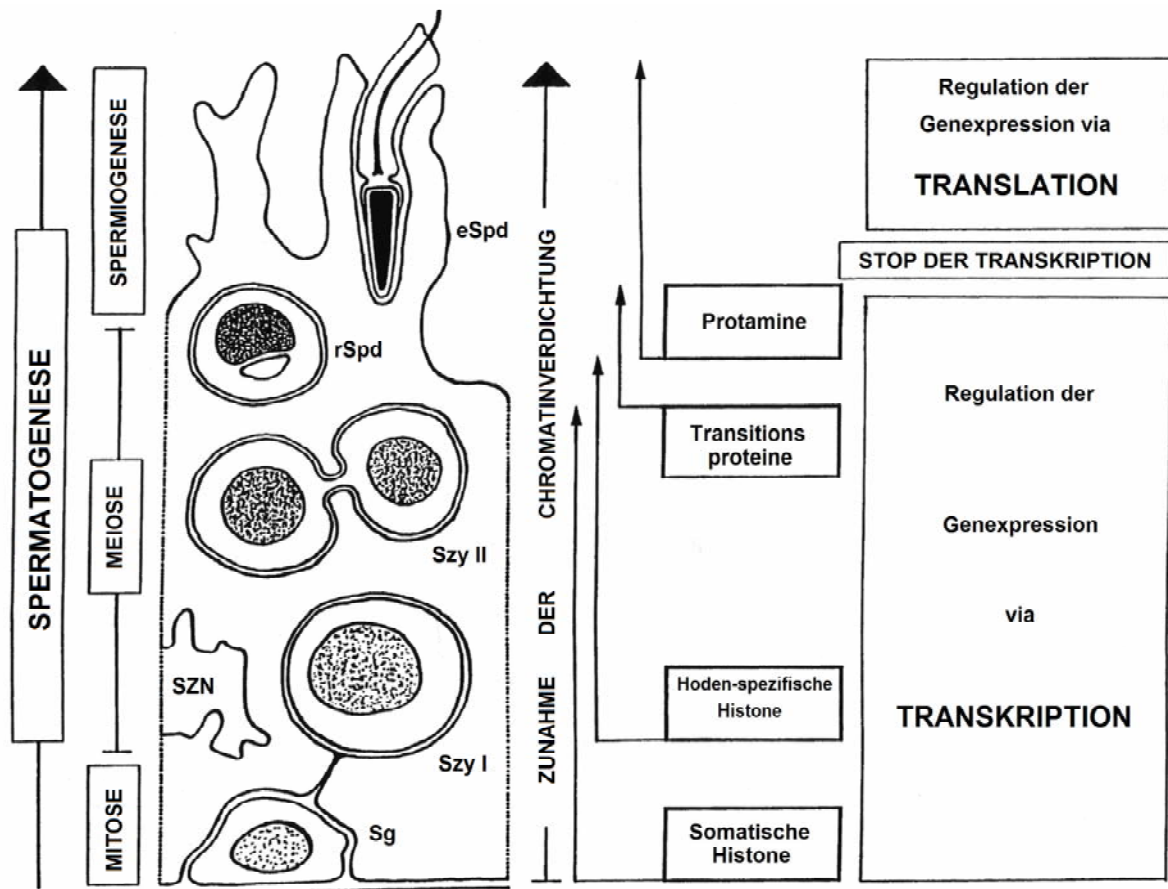


Abb. 2:

Kontrolle der Genexpression während der Spermatogenese (Steger, 1999)

2.3. Messenger Ribonukleoprotein Partikel (RNP)

Transkripte werden als translatorisch repressierte mRNA gespeichert und diese werden erst nach dem Stadium der elongierten Spermien translatiert. Daneben werden mRNAs in Ribonukleoproteine (RNPs) gespeichert, die nach Steger (1999) in den Chromatin-körperchen in der Nähe des Kernes gelagert werden.

In diesen Chromatinkörperchen sind nicht alle mRNA/RNPs gespeichert, Tnp1 und Prm1 (Maus) befinden sich weder in diesen Körperchen, noch an den Membranen. Auch GAPDHS, eine spermienspezifische Form des GAPDH, befindet sich nicht in gespeicherter Form in den Spermien, sondern liegt als freie mRNA vor (Schmidt et al., 1999). Die Bedeutung dieser freien mRNA ist noch nicht endgültig geklärt, da eigentlich

nach der Phase der Elongation keine Transkription mehr stattfinden sollte. Schmidt et al. (1999) behaupten, dass mRNAs die zum Stadium der Rund-Spermatiden transkribiert wurden genunabhängig in mRNPs eingelagert werden. Es gibt keine Untersuchungen zu mRNAs aus später in der Spermatogenese stattfindenden Transkriptionsvorgängen, die in mRNPs gespeichert werden.

Es wurde früher die Hypothese vertreten, dass keine mRNAs in Stadien ab den elongierten Spermien mehr existieren könnten, da diese entweder in RNPs umgebaut oder abgebaut wurden (Monesi, 1965). Miller et al. (2000) zeigten durch *In-situ*-Hybridisierung, dass freie mRNAs in ejakulierten Spermien existieren, ein Zeitpunkt der Transkription der untersuchten Gene *HSPA4* (früher Heat Shock Protein 70, *HSP70*) und *HSP90*, *ACTB* (beta-Aktin) und *PRM2* wurde nicht ermittelt. Steger (2001) vermutete deshalb, dass die in ejakulierten Spermien und Nebenhodenspermien nachgewiesenen freien mRNAs nicht während der Spermiogenese transkribiert wurden, sondern aus unbekannten Gründen nur Überbleibsel aus den Spermatiden darstellen. Auch Wykes et. al. (1997) bestätigten die Anwesenheit von freien *PRM1* und *PRM2* mRNAs in den reifen Spermien.

In den Chromatinkörperchen ist trotz des Vorhandenseins von Poly-A-Binding-Protein (PABP) kaum Poly-A-mRNA nachzuweisen außerhalb der Körperchen hingegen schon. Somit beinhalten ejakulierte Spermien sowohl aus RNPs, als auch aus mRNAs. Eine Unterscheidung zwischen RNPs und freien mRNAs ist durch die RT-PCR nicht möglich (Steger 2001).

2.4. Postmeiotische Transkription

Die Untersuchungen von Hendriksen et al. (1995) zeigten die postmeiotische Expression (haploide 1n) von fünf X-chromosomalen (*Ube1*, *Mhr6a*, *Fmr1*, *Pdha1*, *Xist*) und 2 Y-chromosomalen (*Ube1y*, *Sry*) Transkripten in Mauspermien. Die mRNA-Transkripte von *Fmr1* und *Ube1x* wurden in allen Keimzelltypen gefunden, die größte Transkriptmenge an *Ube1* wurde in runden Spermatiden und in Zytoplasmafragmenten nachgewiesen. Diese Untersuchung zeigte außerdem, dass

Mhr6a mRNA postmeiotisch in runden Spermatiden transkribiert wurde. *Fmr1* mRNA war schon in Typ A1 Spermatogonien hoch exprimiert. *Pdha1* Transkripte wurden in kleinen Mengen in pachytenen Spermatozyten präpariert, und fehlten ganz in runden Spermatiden und in Zytoplasmafragmenten. Die Menge an *Xist* Transkripten war in runden Spermatiden geringer als in pachytenen Spermatozyten, während in Zytoplasmafragmenten *Xist* mRNA nachgewiesen wurde. Hendriksen et al. (1995) folgerten, dass die Inaktivierung von X- und Y-Chromosomen während der Spermatogenese nur auf den Zeitpunkt der Meiose begrenzt ist. Die Y-chromosomalen Gene *Ube1y* und *Sry* zeigten einen höheren Transkriptlevel in runden Spermatiden als in den pachytenen Spermatozyten. Interessant ist die Speicherung von *Sry* mRNA in den Zytoplasmafragmenten von elongierten Spermatiden. Nach Hendriksen et al. (1995) ist es unwahrscheinlich, dass die *Sry* mRNA eine wichtige Funktion in diesen Zellen hat, da diese mRNA bei Mäusen ein zirkuläres Molekül darstellt und nicht translatiert wird. Das *Sry* Gen spielt in der Geschlechtsdetermination des Embryos eine große Rolle, da es *Sox3* hemmt und *Sox9* aktiviert, was z.B. für die Hodenentwicklung wichtig ist. Transkripte des *Sry* Gens werden in Embryonen ab dem 2-Zell-Stadium nachgewiesen (Edwards and Beard, 1999).

Die postmeiotische Reaktivierung des X-Chromosoms wirft die Frage auf, warum die Gentranskripte von *Pdha1* und *Pdk1* während der Spermatogenese durch die Isoenzyme *Pdha2* und *Pdk2* (autosomal genkodiert) ersetzt werden. Während der Spermatogenese werden X-kodierte Gene zu hodenspezifischen autosomalkodierten Genen transformiert. Solche Gene sind zum Beispiel: *Gapdh*, *Ldhc* (Laktat-Dehydrogenase C) und *Cyc1* (Cytochrom c1) (Hendriksen et al., 1995). Alle bis jetzt bekannten Y-chromosomalen Gene der Maus wurden in postmeiotischen Spermatiden transkribiert, die Transkription der X-chromosomalen Gene zeigt eine unterschiedliche Regulation nach dem Stadium der Meiose (Hendriksen et al., 1995).

Das Proakrosin-Gen wird bei Mensch, Bulle und Eber in haploiden runden Zellen, bei Ratte und Maus schon in pachytenen Spermatiden transkribiert. Adam3a (früher Cyritisin 1), welches an der Interaktion Eizelle-Spermium beteiligt ist, wird in diesen

Stadien transkribiert und kurz darauf translatiert. Auch Haprin, das ebenfalls bei der Spermium-Eizell-Interaktion beteiligt ist, wird postmeiotisch exprimiert (Kitamura et al., 2003). Anti-Haprin Antikörper, die die Poren der Plasmamembran durchdringen können, zeigten, dass Antikörper gegen die N-terminale Region, aber nicht gegen die C-terminale Region des Haprins die Akrosomreaktion hemmen konnten (Kitamura et al., 2003).

Nach Miller et al. (1999) befinden sich in Spermien eine große Anzahl RNAs in Form von RNPs und freien mRNAs. Die Stabilität und die Translation der Transkripte wird durch die Einwirkung des poly-A Binding Proteins (PABP) vermittelt. Das Fehlen von PABP führt zur schnellen Zerstörung der RNA (Steger, 2001).

2.5. Mitochondrien

Untersuchungen von Diez-Sanchez et al. (2003) zeigten, dass Mitochondrien in ejakulierten Spermien keine Proteine synthetisieren. Mittels S35 Methionin wurde im Vergleich ejakulierter Spermien und humanen mitochondrialen Referenzmustern kein mtDNA-kodiertes Protein nachgewiesen.

2.6. Interzelluläre Brücken

In der oogamen Reproduktion der mehrzelligen Organismen wird ein Phänomen der synchronen Entwicklung der männlichen Gameten mit Hilfe der interzellulären Brücken beobachtet. Solche Verbindungen kommen von Algen bis zum Mensch vor und haben speziesabhängig einen Durchmesser von 0,1 bis 2 μm (Guo und Zheng, 2004). Die Funktion dieser interzellulären Brücken ist noch nicht vollständig geklärt. Postuliert wurde eine Versorgungsfunktion mit Genprodukten u. a. der X-Chromosom-tragenden Spermatiden über diese Brücken zu den Y-Chromosom-tragenden, um deren Überleben zu gewährleisten oder um möglicherweise defekte Genkopien auszugleichen, die im diploiden Zellzustand nicht zur Wirkung kommen würden (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Braun et al. (1989) beschrieben den Austausch von Genprodukten über diese interzellulären Brücken. Hierfür wurden transgene Mäuse erstellt, die das hGH (menschliches Wachstumshormon) Gen unter Prm1-Promoter Kontrolle (Maus) besaßen. Der Vorteil lag darin, dass dieses Gen nur heterozygot vorkam und nur während der Spermatogenese (in der haploiden Phase) exprimiert wurde. Mittels Immunhistochemie wurde nachgewiesen, dass diese Gentranskripte in allen Spermien sichtbar waren und nicht nur in 50% der Zellen, wie dies eigentlich erwartet wurde. Braun et al. (1989) folgerten, dass somit alle Gentranskripte während der Spermiogenese über diese interzellulären Brücken ausgetauscht werden.

Untersuchungen des testis/brain RNA-binding Proteins (TBRBP), das an konservierte Sequenzen in spezifischen mRNAs (wie z. B. PRM2 in Verbindung mit Ter-ATPase) bindet, zeigten eine Komplexbildung mit AKAP4 (Kinase A Anchoring Protein 4) und Austausch dieses Komplexes über die interzellulären Brücken (Morales et al., 2002). Der Transport zwischen haploiden Spermatiden sollte nur dann stattfinden, wenn Gene vom X- oder Y-Chromosom transkribiert werden und diese essentiell für die Entwicklung aller Spermien sind (Morales et al., 2002). Ein solches Gen ist AKAP4, welches nur in X-Chromosom-tragenden Spermien am Ende der Spermatogenese transkribiert wird (Moss et al., 1997). Ebenso geht TBRBP einen Komplex mit PRM2 ein und kann einen Austausch über die interzellulären Brücken ermöglichen (Morales et al., 2002). Es wird vermutet, dass die haploiden Spermatiden mit allen Produkten des vollständigen diploiden Genoms durch die interzelluläre Brücken versorgt werden und somit ein identisches Profil hinsichtlich ihrer Transkripte aufweisen müssten (Morales et al., 2002; Gilbert, 2003; Ventela et al., 2003). Eine Bestätigung dieser Hypothese wurde bis heute nicht erbracht.

Interessanterweise kommen solche interzellulären Brücken nicht nur bei Heterogameten vor, sondern auch bei den männlichen Homogameten (z. B. *Gallus gallus* (ZZ)) oder bei selbst befruchtenden Hermaphroditen (z. B. *Caenorhabditis elegans* (XX)). Bei diesen Spezies entsteht während der Meiose kein geschlechtschromosomales Ungleichgewicht zwischen den Spermatiden (Guo und Zheng, 2004). Die Funktion der interzellulären Brücken liegt somit nicht nur im

Ausgleich der heterogenen haploiden Transkripte während der Entwicklung der männlichen Keimzellen (Morales et al., 2002), sondern auch in der Synchronisierung der Differenzierungs- und Reifungsprozesse in Spermien (Guo und Zheng, 2004). Die Voraussetzung einer erfolgreichen Befruchtung bei mehrzelligen Organismen liegt in der großen Zahl und der hohen Qualität der männlichen Gameten. Die empirischen Erfahrungen zeigten, dass hochqualitative männliche Gameten relativ uniform in der Struktur und Morphologie sind. Andererseits, ist ein hohes Maß an heterogenen Zellen oft mit reduzierter Fruchtbarkeit oder sogar Sterilität assoziiert (Coetzee et al., 1998; Perez-Pe et al., 2002).

Die Verteilung des Zytoplasmas zwischen den gekoppelten Spermien erfolgt gleichmäßig, aber nicht zufällig durch einen aktiven interzellulären Transport. Dies wurde von Ventela et al. (2003) beobachtet. Spezifische Organellen, so genannte Chromatinkörperchen, der männlichen Keimzellen beinhalten RNAs (und möglicherweise auch Proteine und Ribosomen). Diese Körperchen bewegten sich „hin und zurück“ durch die interzellulären Brücken zwischen den benachbarten Spermatiden und hatten flüchtigen Kontakt mit den Kernen beider Zellen (Ventela et al., 2003). Dies scheint eine typische Art der Synchronisation zwischen den männlichen Keimzellen zu sein (Guo und Zheng, 2004).

2.7. RNA Moleküle in Spermien und somatischen Zellen im Vergleich

Ribonukleinsäuren oder RNA können als kodierende und nicht kodierende Moleküle unterschieden werden. Zu den kodierenden zählen die am meisten erforschten RNAs, wie messenger RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA) und die transfer-RNA (tRNA) (Storz, 2002). Seit kurzem gewinnen so genannte nicht kodierende RNA (noncoding RNA oder ncRNA) an wissenschaftlichem Interesse, da diese RNAs in unterschiedlichsten Prozessen der Zelle mitbeteiligt sind.

Die erstgenannten drei RNA-Arten sind für die Ausführung der Erbinformation ausgehend von der DNA bis zur Proteinsynthese verantwortlich. In somatischen Zellen sieht die RNA-Verteilung ungefähr folgendermaßen aus: 80-85% rRNA, 15-

20% tRNA und die restlichen 1-5% setzen sich aus mRNA, small nuclear RNAs (snRNA) und ncRNAs zusammen (Alberts et al., 1997). Die Menge an Gesamt-RNA variiert von Zelle zu Zelle, je nach deren Aktivität und Zugehörigkeit zu den jeweiligen Gewebearten. Bspw. kann aus 1 mg Leber- oder Milzgewebe ca. 6-10 µg Gesamt-RNA isoliert werden, dagegen aus 1 mg Skelett Muskeln oder Gehirn nur ca. 1-5 µg Gesamt-RNA (Angaben der Fa. Qiagen).

Spermien sind hochspezifische Zellen mit einer einzigartigen Funktion. Unterschiede zwischen Spermien und somatischen Zellen bestehen einerseits in dem Vorkommen der oben genannten RNPs, andererseits ist die Menge der Gesamt-RNA drastisch reduziert, hier vor allem die der ribosomalen und transfer RNAs (Ostermeier et al., 2002). Die Gesamtmenge an RNA beträgt ungefähr 0,015 pg pro Spermium (Miller et al., 2005). Die Verteilung der RNA in die drei Arten ist in Spermien nicht untersucht worden.

Untersuchungen mittels vergleichender Gelelektrophorese zeigten, dass die ribosomale RNA während der Spermienreifung fast vollständig verloren geht (Ostermeier et al., 2002). Dies könnte bedeuten, dass eine Proteinsynthese bei reifen Spermien nicht mehr möglich oder stark reduziert stattfinden würde. Die Funktion der restlichen RNAs ist Gegenstand aktueller Forschungen (Kono et al., 2004; Lambard et al., 2004; Ostermeier et al., 2004; Miller et al., 2005).

2.8. Histongebundene Fragmente in Spermien DNA

Wie bereits beschrieben, werden während der Spermatogenese die Histone durch Transitionsproteine und anschließend durch Protamine ersetzt. Kurz danach kommt es zum Stillstand der Transkription. Allerdings wurden beim Menschen und anderen Säugetieren in mehreren Studien histongebundene Chromatinfragmente nachgewiesen (Balhorn et al., 1997; Soon et al., 1997; Wykes et al., 2003). Beim Menschen sind ca. 15% der gesamten DNA (Wykes et al., 2003), bei der Maus ca. 1% (Balhorn et al., 1997) gebunden. Die Verteilung der Histone und Protamine im Spermienkern ist nicht zufällig, sondern geordnet (Wykes et al., 2003). Sowohl bei

der Maus als auch beim Menschen befinden sich die Histone in der Kernperipherie. Die Untersuchungen zur Chromatinstruktur der β -Globin-Gengruppe in Spermien zeigten, dass die embryo-spezifischen ϵ - und γ -Globin Gene in Histone gebunden waren, während postnatal exprimierte β -Globin Gene in Protamine verpackt wurden (Gardiner-Garden et al., 1998). Auch die Telomerregion ist bei Humanspermien in Histone verpackt (Zalenskaya et al., 2000). Somit hat diese Anordnung des unterschiedlich verpackten Chromatins eine funktionelle Bedeutung.

2.9. Rolle der RNAs in der strukturellen und funktionellen Organisation der Spermienkern DNA

Die räumliche Anordnung der Spermienkernbestandteile (DNA-Verpackung und nuklearen Matrix/Gerüst/Hülle) wurden von Miller et al. (2005) untersucht und mit der Anordnung in somatischen Kernen verglichen (Abb. 4). Der Unterschied zwischen den zwei Zelltypen liegt in der Verpackung der DNA. Die DNA der somatischen Zellen ist in Histone verpackt, diese bilden dann die Nukleosomen und haben die Form eines „Solenoids“. Diese Kerne sind transkriptionell voll aktiv. Im Gegensatz dazu hat die enge Chromatin-Verpackung mit Protaminen in den Spermienkernen zur Folge, dass diese eine so genannte „Torrid- oder Doughnut-Struktur“ haben und transkriptionell inaktiv sind.

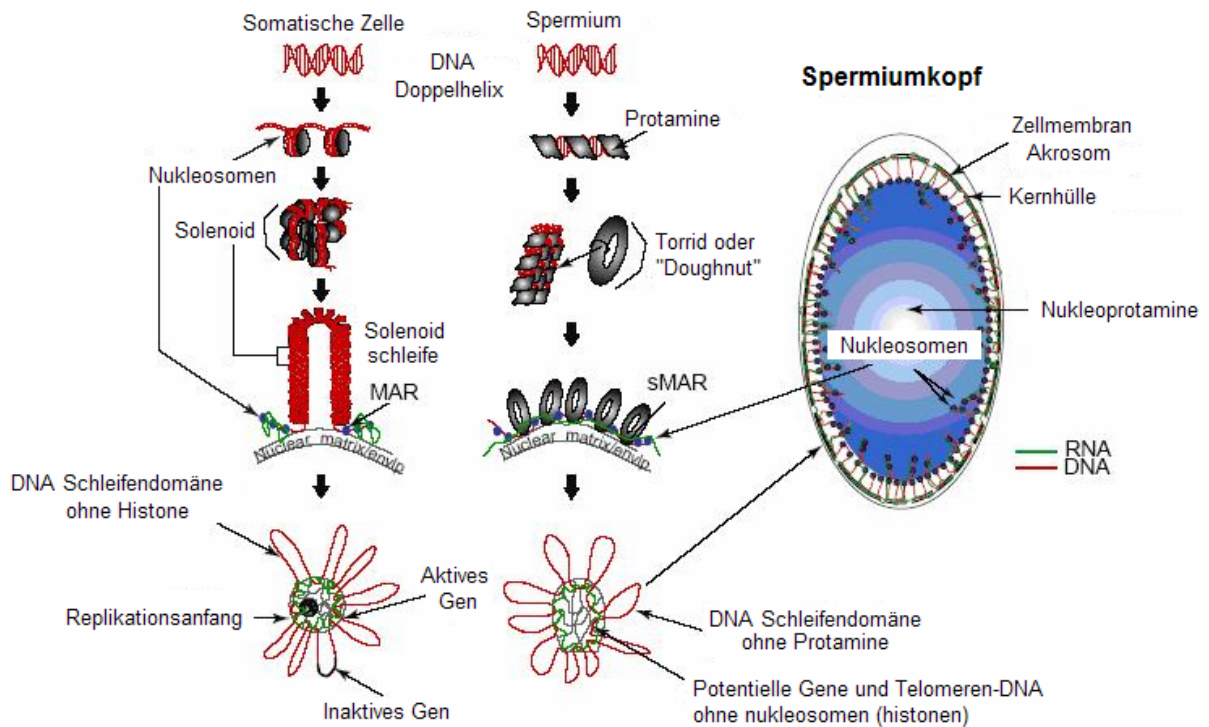


Abb. 4:

Mögliche Verhältnisse zwischen DNA, RNA und Kerngerüst bei somatischen Zellen und Spermien. (entnommen aus Miller et al., 2005)

Allerdings haben die beiden Zelltypen auch eine gewisse Ähnlichkeit. Die DNA ist sowohl in den Spermien als auch in den somatischen Zellen in Schleifendomänen geordnet und an der Basis der Kernmatrix gebunden. Diese Kontaktstellen wurden als Scaffold oder Matrix Attachment Regions (S/MARs) bezeichnet (Miller et al., 2005). Die DNA-Schleife und die Region in der Matrix und Hülle verbunden sind, bleiben bei beiden Zelltypen erhalten. Die strukturelle Organisation der DNA wird durch das Kerngerüst gebildet. Die Nukleosome binden zu den histonfreien Schleifendomänen, die sich gegenseitig in der „Gerüst-Hülle“ assoziierten Region beeinflussen. Die RNA umschreibt und hält die Nukleoprotamin-Histon Abgrenzung aufrecht. Diese Grenze hat ihren Ursprung in der protaminreichen Region und deren beide Seiten wirken durch die RNA des Gerüsts aufeinander (Miller et al., 2005).

Solch eine topografische Organisation der RNA im Spermienkern könnte möglicherweise eine Genexpression erlauben. Obwohl das Spermienchromatin nicht *de novo* erzeugt werden kann, gibt es scheinbar Regionen, die für eine Expression zuständig sind. Miller et al. (2005) behaupteten, dass es möglicherweise unter bestimmten Voraussetzungen zu einer Lockerung oder einem Verlust dieser Protaminverbindungen kommt, so dass diese Regionen für Transkriptionsfaktoren zugänglich wären. Darauf würde die besondere Anordnung des inaktiven Spermienchromatins hindeuten. Möglicherweise spielt bei diesem Prozess die RNA eine entscheidende Rolle, da sie als einer Art Abgrenzung zwischen den Histon- und Protaminverpackten DNA-Fragmenten fungiert und die Wiederverpackung der Histone durch die Protamine verhindert (Miller et al., 2005). Diese Vermutung wurde von Pittoggi et al. (1999) mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Hier zeigte sich, dass sowohl die Spermien RNA als auch die Spermienhistone sich in der Peripherie des Spermienkerns befanden. Diese mit dem Spermengerüst assoziierte RNA könnte die vermuteten Expressionorte des Spermienchromatins vor dem „Einschlafen“ des Nukleus abgrenzen (Miller et al., 2005).

Diese besondere Organisation des Spermienkerns ist bedeutend für eine erfolgreiche Befruchtung und Embryoentwicklung. In Untersuchungen von Ward et al. (1999) wurde die essentielle Rolle der intakten Hülle des Spermiums bei der Befruchtung nachgewiesen. Diese Arbeitsgruppe extrahierte Kerne von Mausspermien unter Erhaltung der Strukturen und injizierte diese in Mäuseeizellen. Die Embryoentwicklung danach war vollständig gegeben. Auf der anderen Seite kam es zu keiner Entwicklung des Embryos, wenn die Befruchtung mit den strukturell zerstörten Zellkernen stattfand (Ward et al., 1999).

In einer anderen Untersuchung an Knockout-Mäusen (Cho et al., 2003) wurde die Rolle der Protaminverpackung (Prm1 oder Prm2) der DNA bestätigt. Die Protamine sind nicht nur für die Kompaktierung der DNA essentiell, sondern schützen sie auch vor der Zerstörung und machen die Spermien gegenüber Umwelteinflüssen stabil. Eine moderate Verringerung der Protaminmenge (PRM1 und/oder PRM2) hatte zur

Folge, dass die DNA durch die strukturelle Unordnung zerstört wurde und das paternale Genom nicht an die nächste Generation weitergegeben wurde.

2.10. RNA: Mögliche Ursache für Unfruchtbarkeit

Ostermeier et al. (2002) führten die ersten Korrelationen von Fertilitätsparametern auf Basis der Spermien-RNA durch. Hierfür wurden mittels EST (expressed sequence tags) Microarrays von RNAs ejakulierter Spermien und Hoden durchgeführt. Die Hybridisierung wurde mit Proben aus Hoden-cDNA, Poolejakulat-cDNA und Individuumejakulat-cDNA durchgeführt. Ein EST wurde als positiv im Poolejakulat aber nicht im Hoden, und ein EST im Individuumejakulat aber nicht im Poolejakulat und Hoden nachgewiesen (Ostermeier et al., 2002). In der Hodenprobe wurden 7.157 einzigartige ESTs identifiziert, dies ist vergleichbar mit dem Ergebnis aus Spermien der Pool- oder Individuum-RNA. Hoden- und Spermien-RNAs zeigte große Übereinstimmung, wobei vier unterschiedliche ESTs von 2.784 ESTs im Individuum-Ejakulat und in 3.281 ESTs des Poolejakulats enthalten waren. Ostermeier et al. (2002) behaupteten, dass in ejakulierten Spermien eines normalen fertilen Mannes wenigstens 2.686 aber nicht mehr als 2.882 der möglichen 27.016 ESTs enthalten sind. Zur Sicherheit wurde die Spermien-mRNA mit Leukozyten-mRNA verglichen. Identisch waren nur die ubiquitären Housekeeping Gene, es wurde somit eine sehr reine Population an Spermien-mRNA untersucht (Ostermeier et al., 2002).

Das cAMP-regulatorische Element modulator (CREMtau) kommt nur in haploiden Zellen vor und wird von einer Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. CREMtau ist ein Mitglied des Adenyl-Zyklase Pathway während der Spermiogenese. Mutationen im menschlichen FMR1-Gen führen zum Fragile X Syndrome, das beim Mensch und bei Mäusen zur Infertilität führt (Miller 1997).

Bullenspermien, die in der IVF eingesetzt wurden, befruchteten die Eizellen mit unterschiedlichem Erfolg pro Tier (Ward et al., 2001). Die Lebensfähigkeit der Spermien nach der Kryopreservation wurde durch die Untersuchungen von Motilität, ATP-Messung, Vollständigkeit der Membran, Messung des osmotischen Widerstands

geprüft. Die Befruchtungs- und Entwicklungsraten der Embryonen korrelierten nicht mit den Untersuchungsergebnissen der Spermien (Ward et al., 2001). Unabhängig von den Vatertieren war auch die Zeit der Befruchtung entscheidend. Frühbefruchtete Eizellen/Zygoten entwickelten sich eher bis zum Blastozystenstadium, als die Spätbefruchteten. Der Zeitpunkt der ersten Zellteilung variiert zwischen den verschiedenen Bullen und diese Kinetik von früher oder später Spaltung kann zu der Unterscheidung der Bullen mit hohen bzw. niedrigen Befruchtungsvermögen herangezogen werden. Die *in-vitro* Fertilität von Bullen beeinflusst somit die Zeit des Beginns und die Dauer der ersten DNA Replikation. Der mütterliche Genotyp wurde nicht mit in die Regulation des Beginns der ersten DNA Replikation einbezogen, auch die Frage welche (Spermien-)internen Faktoren diese Ergebnisse bedingen, ist unklar (Ward et al., 2001).

2.11. Spermientranskripte werden während der Befruchtung in die Eizelle eingeschleust

In Untersuchungen von Ostermeier et al. (2004) wurden die Erkenntnisse der Mikro-Array-Analyse für eine andere Fragestellung angewendet. Ist die Spermien RNAs essentiell für die Befruchtung und Entwicklung des Embryos?

Mittels Mikro-Array-Technik wurden einige Transkripte entdeckt, die für die Befruchtung, Entwicklung der Zygote und auch für die Embryogenese wichtig sein könnten, und die sich üblicherweise im Hoden und in Spermien befinden. Versuche von Ostermeier et al. (2004) zeigten die Anwesenheit der Transkripte (*CLU*, *AKAP4*, *PRM2*, *FOXG1B* und *WNT5A*) in den Spermien, aber nicht in den unbefruchteten Eizellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Übergabe der Spermien-RNAs in die Eizelle während der Befruchtung stattfindet. Scheinbar haben manche von diesen RNAs einen direkten Einfluss auf die Entwicklung der Zygote. Zum Beispiel wurde *CLU* (Clusterin, früher bekannt als sulfatiertes Glykoprotein-2, SGP-2) in die Eizelle eingeschleust und in die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktionen miteinbezogen. Außerdem erhöhte es die Fertilitätsrate, stabilisierte die Stressproteine und beschleunigte oder hemmte die Apoptose (Ostermeier et al., 2004). Auch die sonst bekannten für die Befruchtung (*AKAP4* und *PRM2*) und für die Embryogenese wichtigen Transkripte (*FOXG1B* und *WNT5A*) wurden in Spermien, aber nicht in Eizellen nachgewiesen. Nach Ostermeier et al. (2004) sind diese Gene wichtig für die frühe Zygotenbildung, aber unwichtig für die unbefruchtete Eizelle. Es wird vermutet, dass auch andere, hier nicht identifizierte Moleküle, wie kurze interferierende RNAs (siRNAs), sich an den Prozessen der Kerngestaltung beteiligen und die Aktivierung der Eizelle und den Übergang von der maternalen zur embryonalen Genkontrolle dirigieren (Martins und Krawetz, 2005). In somatischen Zellen regulieren diese RNAs u. a. die Regulation der Transkription oder die Chromosomreplikation (Plasterk, 2002; Storz, 2002; Zamore, 2002).

2.12. Erzeugung parthenogenetischer Nachkommen

Die Entwicklung von lebensfähigen Nachkommen bei den Säugetieren war bis jetzt nur durch die Vereinigung der männlichen mit der weiblichen Keimzelle möglich. Parthenogenetisch produzierte Embryonen, bei denen nur zwei mütterliche Keimzellen beteiligt waren, starben nach ca. 10 Tagen der Gestation. Für eine erfolgreiche Entwicklung war bisher die bipaternale Reproduktion nötig, bei der die spezifischen elterlichen epigenetischen Modifikationen des Genoms vorhanden waren. Dennoch gelang es Kono et al. (2004), lebensfähige Nachkommen von rekonstruierten Mäuseeizellen zu erhalten. Dafür wurde das Genom von reifen (nicht modifizierten) und unreifen (modifizierten) Eizellen benötigt. Die parthenogenetische Entwicklung war erst möglich, nachdem Mutanten bei den unreifen Eizellen mit einer 13 Kilobasen großen Deletion auf dem *H19* Gen erzeugt wurden. Durch die Erhöhung der Aktivität des *Igf2* Gens und gleichzeitiger monoalleler Expression des *H19* Gens im parthenogenetischen Embryo war es zum ersten Mal möglich lebensfähige adulte Mäuse aus zwei maternalen Genome zu bekommen. Im Embryo sind *H19* und *Igf2* reziprok ausgeprägte Gene, mit nur maternal exprimierten *H19* und paternal exprimierten *Igf2* Allelen. Die Deletion des *H19* in der eingeführten unreifen Eizelle führte zu einem epigenetischen Gleichgewicht und gestattete die weitere Entwicklung des Embryos (Miller et al.; 2005). Interessanterweise ist bekannt, dass das *Igf2* Gen durch Histone verpackt wurde (Wykes und Krawetz, 2003). Möglicherweise hält die RNA-vermittelte Wiederverpackung des Chromatins in den Spermien diese epigenetischen Veränderungen aufrecht (Miller et al.; 2005).

Die epigenetische Modifikation des Gametengenoms findet gewöhnlich während der Gametogenese statt. Das Spermienchromatin wird während der späten Spermatogenese vollständig methyliert, in der Eizelle hingegen findet eine allmähliche Methylierung vor allem während dem Eizellwachstum und der -reifung statt. Kurz nach der Befruchtung wird das Spermienchromatin vollständig demethyliert, mit Ausnahme der väterlich geprägten Gene, inklusive *H19* (Miller et al.; 2005).

2.13. Korrelation zwischen Spermienmotilität und -transkripten

Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien zählt zu den wichtigsten Parametern für die Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit ejakulierter Spermien (Hirano et al. (2001). Bongso et al. (1989) zeigten eine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Spermienbewegung und der Fertilisationsrate.

Lambard et al. (2004) untersuchten das Verhältnis zwischen der mRNA und der Motilität und Kapazitation der Spermien von normozoospermischen Spendern. Mit Hilfe eines diskontinuierlichen Dichtegradienten wurden die Spermien in zwei Fraktionen unterteilt: Fraktionen mit hoher und mit niedriger Spermienmotilität. Bei beiden Fraktionen wurde der Level an ausgewählten mRNA Transkripten untersucht und die Transkripthöhe zwischen den Fraktionen verglichen. Es wurden die Transkripte, die für die Kondensierung des Kernes (*PRM1* und 2) oder für die Kapazitation (endotheliale Stickoxid Synthetase *eNOS*, neuronale Stickoxid Synthetase *NOS2A* und *MYC*) zuständig sind, mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Abhängigkeit zwischen der Spermienmotilität und der Menge einiger Transkripte vorliegt. Die Transkriptmenge an *PRM1* in Spermien mit niedriger Motilität war deutlich höher als in Spermien mit hoher Motilität. In den meisten Proben mit hochmotilen Spermien waren Transkripte der *eNOS* und *NOS2A* (früher *nNOS*) mRNA nicht nachweisbar, im Gegensatz zu den weniger motilen Spermien. Es wurde kein Unterschied in den Transkripthöhen der *PRM2*- und *MYC* (früher C-MYC) mRNAs zwischen den beiden Fraktionen festgestellt. Außerdem wurde ein teilweises Verschwinden der *MYC* Transkripte nach der Kapazitation beobachtet (Lambard et al., 2004).

Eine andere Forschergruppe untersuchte die Beziehung zwischen der Spermienmotilität und mRNA-Transkripten mittels quantitativer RT-PCR. Allerdings wurden hier gepoolte Proben von Ejakulaten mit hohen und niedrigen Spermienmotilitäten untersucht. Ein Vergleich der Transkripte, die für die normale Funktion der Spermien relevant sind, wie *CRISP2* (cysteine-rich secretory protein 2, früher TPX-1, testis-specific protein 1), *AKAP4*, *ODF2* (outer dense fiber of sperm

tails 2 isoform 1), *LDHC* (lactat dehydrogenase C) und *CLGN* (calmegin) zeigten eine deutliche Erhöhung der Transkriptabundanz zweier Gene (*CRISP2* und *LDHC*) bei den hochmotilen Spermien und deren Senkung bei den niedrigmotilen (Wang et al., 2004).

2.14. Entdeckung der stabilen Spermien RNA

RNA-Moleküle sind äußerst instabil und werden in somatischen Zellen schnell von RNasen abgebaut. Ostermeier et al. (2005) untersuchten Spermien RNA-Proben, die in drei Fraktionen geteilt und anschließend unterschiedlich behandelt wurden. Die erste Fraktion bestand aus Proben mit „idealer Qualität“, bei denen die Spermien direkt nach der Gewinnung bei -80°C gelagert und nach dem Auftauen sofort weiter verarbeitet wurden. Die zweite Fraktion umfasste die Proben mit „mittlerer Qualität“, bei denen die Spermien ca. 30 Min. bei Raumtemperatur auftauten und anschließend wieder bei -80°C eingefroren und nach einem weiteren Auftauprozess verarbeitet wurden. Die letzte Spermienfraktion hatte „schlechte Qualität“, diese wurde drei Einfrier-Auftau Zyklen unterzogen und erst dann weiter behandelt. Die Proben wurden mittels Mikro-Array analysiert und die Ergebnisse untereinander verglichen. Die Proben mit idealer Qualität hatten 132 überlappende ESTs. Der Vergleich zwischen den Proben mit hoher und mittlerer Qualität zeigte 96 Übereinstimmungen und der Vergleich aller drei Proben miteinander zeigte nur 37 gemeinsame in allen Proben vorkommende ESTs (Ostermeier et al., 2005). Diese mRNAs bezeichneten Ostermeier et al (2005) als stabile mRNAs beim Mann. Untersucht wurde nicht, warum diese mRNAs diese Stabilität besitzen. Es ist nur bekannt, dass sie alle in der nuklearen und perinuklearen Region lokalisiert sind. Ostermeier et al. (2005) vermuteten, dass möglicherweise diese RNAs den Kern innen „auskleiden“, um ihn zu schützen und somit ihre Übertragung in die Eizelle während der Befruchtung garantieren.

Weiter vermuteten Ostermeier et al. (2005), dass die mRNAs der ejakulierten Spermien eine Widerspiegelung der Spermatogenese darstellen würden und eine Untersuchung dieser Transkripte Rückschlüsse auf eine intakte oder beeinträchtigte

Spermatogenese erlauben würden. Ostermeier et al. (2005) schreiben diesen stabilen RNAs eine Funktion als prognostische Marker der männlichen Fertilität zu.

2.15. RNA-Isolierung

In der Literatur sind bis heute keine Methoden zur RNA-Gewinnung aus Eberspermien beschrieben. Des weiteren finden sich auch bei der Isolation von Spermien-RNA anderer Spezies kaum Angaben zu Art und Auswirkungen der beschriebenen Änderungen „klassischer“ RNA-Isolationsprotokollen (z. B. Chomczynski und Sacchi, 1987) aus Organgewebe. Nachfolgend werden einige Methoden zur Gewinnung von RNA aufgeführt.

2.15.1. Klassisches Protokoll zur Gesamt-RNA Gewinnung

Chomczynski und Sacchi (1987) entwickelten eine „Ein-Schritt“ RNA-Isolationsmethode. Zur vollständigen Denaturierung aller Proteine wurde die chaotrope Verbindung Guanidinisothiocyanat und saures Phenol verwendet. Auf diese Weise war es möglich innerhalb weniger Stunden die Gesamt-RNA aus einer großen Probenanzahl mit guter Qualität zu isolieren. Die Proben (maximal 200 mg) werden mit 1 ml Guanidinisothiocyanat und saurem Phenol und 200 µl kaltem Chloroform versetzt und homogenisiert. Anschließend werden die Tubes zentrifugiert und die obere wässrige Phase mit der RNA abgenommen und in ein neues Tubes überführt. Nach Fällung der RNA mit 1 ml kaltem Isopropanol und anschließender Zentrifugation wird die RNA mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst.

2.15.2. Protokolle zur RNA-Gewinnung aus Spermien

Für die Isolierung der RNA aus den Spermien des Mannes wurde von Miller et al. (1994) eine weiter modifizierte Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) benutzt. Die Spermien wurden zuerst einem osmotischen Schock unterzogen. Ein Spermienpellet aus ca. 100 Millionen Spermien wurde in destilliertem Wasser (4,5 ml) mit 0,1%igem SDS und 0,5%igem Triton X resuspendiert und für 15 Min. auf Eis

inkubiert. Triton X zerstörte die somatischen Zellen, die eventuell im Ejakulat vorhanden waren. Danach wurde die Lösung mit Zugabe von 0,5 ml 10 x PBS in eine physiologische Salzkonzentration gebracht. Die Proben wurden für 5 Min. bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 4 ml Guanidinisothiocyanat resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Min. bei 65°C inkubiert. Nach der Hitzebehandlung wurden 4 ml Phenol dazu gegeben und die Proben gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Volumen Chloroform und anschließender Zentrifugation. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen Natrium Acetat (3 M), 2 Volumen Ethanol (4°C) und Zentrifugation gefällt. Danach wurde die RNA gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst.

Ostermeier et al. (2005) modifizierten einen kommerziell erhältlichen Kit (RNeasy, Fa. Qiagen) für die RNA-Isolation aus Humanspermien. Um somatische Zellen aus den Proben zu entfernen, wurde das Pellet (10 bis 20 Millionen Spermien) in 1 ml destilliertem Wasser mit 0,5%igem Triton X und 0,1%igem SDS für 15 Min. auf Eis inkubiert. Die gewaschenen und abzentrifugierten Spermien wurden mit einem Lysispuffer versetzt und mehrmals mit einer 10 ml-Spritze durch eine Kanüle mit 0,6 mm Durchmesser gezogen. Die Proben wurden für 30 Min. bei 65°C inkubiert und anschließend noch mal mit einer Spritze homogenisiert. Die Lösung wurde auf eine „RNeasy-Säule“ geladen und abzentrifugiert. Dabei heften sich die Nukleinsäuren durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Silika-Gel-Membran der Säulen. Mit einer weiteren Lösung wird die Säule gewaschen, so dass die Lysispufferreste entfernt wurden. Abschließend wurde die RNA gewaschen und von der Membran eluiert.

Bei Krebs und Favor (1997) wurde eine Methode beschrieben, die eine Isolierung von Nukleinsäuren (RNA und DNA) aus Mausspermien erlaubte. Dabei wurden mit PBS gewaschenen Spermien in 10%igem SDS resuspendiert und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation und Waschung der Spermien mit PBS. Das Spermienpellet wurde in 100 µl einer hypotonischen Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂; 4 mM DTT und 0,05%iges SDS) mit 50 µl

Proteinase K (25 mg/ml) für 2 Stunden lysiert. Zu den lysierten Proben wurde 1,5 ml Lysis-Puffer (50 µl Proteinase K und 50 µl 10%iges SDS) pipettiert. Das Gemisch wurde für 1,5 Stunden bei 42°C inkubiert. Anschließend folgte die Phenol-Chloroform Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987).

2.15.3. Andere RNA-Isolierungsmethoden

Von den unterschiedlichen Herstellern werden Fertigpräparate zur Isolierung von Gesamt-RNA oder mRNA aus verschiedensten Zellen und Geweben angeboten. Die klassische Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) findet sich in mehreren Produkten (z. B. TriZol von der Fa. Invitrogen) mit kleineren Veränderungen wieder.

Kohrer und Domdey (1991) etablierten die Methode der RNA-Isolation aus Hefezellen. Die Zellkultur mit 2-4 g Hefezellen wurde abzentrifugiert und in 10 ml Natrium Azetat Puffer (50 mM Natrium Azetat; 10 mM EDTA; pH 5,0) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 0,1 Volumen 10%igem SDS und 1,2 Volumen Phenol (65°C). Die Lösung wurde schnell ins Wasserbad (65°C) gebracht und für 5 Min. unter gelegentlichem Vortexen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Tubes in einem Ethanol-Eisbad abgekühlt. Durch Zentrifugation erfolgte die Trennung in zwei Phasen. Die untere organische Phase wurde mit der Pipette entfernt. Zu dem Rest (wässrige Phase mit Interphase und Zelltrümmer) wurde nochmals heißes Phenol (65°C) gegeben und zentrifugiert. Diesmal wurde die wässrige Phase in ein neues Tube abpipettiert und mit 1 Volumen Chloroform (50% Phenol und 50% Chloroform) versetzt, gevortext und zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt und nachfolgend mit Chloroform-Isoamyl Alkohol (in Verhältnis 24:1) versetzt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase in ein neues Tube abpipettiert, mit 0,1 Volumen Natrium Acetat (3 M, pH 5,3) versetzt und mit 3 Volumen Ethanol mehrere Stunden bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation der Proben wurden diese gewaschen, getrocknet und die RNA in Wasser gelöst.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Automatische Pipette Accu-jet®	Braun, Kronberg
Gewebe-Homogenisator (Art-Micro D8)	ART Labortechnik, Mühlheim
Illuminator Eagleeye II	Stratagene, Heidelberg
Kodak Image Station 440	Rochester, NY, USA
Kühlthermostat F3-CH	Haake, Lisons
Magnetrührer Ikamag® RCT	Ika Labortechnik, Staufen
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle 8521	Privileg
Minishaker MS1	Ika Labortechnik, Staufen
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann, Wunstorf
Rock'n Roller	Breda
Phosphorimager Storm 860	Molecular Dynamics
Schüttler KS 250 basic	Ika Labortechnik, Staufen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Video®Image Analysis System	Zeiss, Oberkochen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, INC., NY, USA
Waage PM 3000	Mettler, Schweiz
Wasserbad SUB 6	Grant Instruments, Shepreth, GB

3.1.2. Gelelektrophorese-Apparaturen

Gibco BRLHorizontal Gel	Life Technologies, Rockville MD, USA
Power Pac 300	Bio-Rad, München
Powersupply PPS 200-1D	MWG-Biotech, Ebersberg

3.1.3. PCR Geräte

T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler Unoll	Biometra, Göttingen
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.1.4. Zentrifugen

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Micro Centrifuge II	Neolab, Heidelberg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge GS-15R	Beckman, München

3.1.5. Chemikalien

Androhep Verdünner	Minitüb, Tiefenbach
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	PeqLab, Erlangen
Guanidinthiocyanat	Roth, Karlsruhe

Hoechst 33342 (Bisbenzimidazole H)	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosine	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN, Irvine, CA, USA
PeqGOLD RNA-Pure™	PeqLab, Erlangen
RNAlater™	Qiagen, Hilden
Rothi®-Aqua-Phenol	Roth, Karlsruhe
Rothi®-Aqua-Phenol/C/I	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SeaKem LE® Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrogenat	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
TriZol™ Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6. Reagenzien und Enzyme

DNaseI (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNaseI 10x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Erststrang-Puffer (5 x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe
HotFirePol Taq-Polymerase	Solis Biodyne, Tatu, Estland
Proteinase K (20 mg/ml)	Boehringer, Mannheim
Qiagen RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Heiden
Random Hexamer Primers (3 μg/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen, Heiden
RNase-Inhibitor (40 U/μl) RNaseOUT™	Invitrogen, Karlsruhe

ROX	Invitrogen, Karlsruhe
SeeDNA	Amersham Bioscience, Freiburg
SuperScript TM II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Heiden
Uracil-N-Glycosidase	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.7. Lösungen

3.1.7.1 Medien, Lösungen und Puffer

<u>10 x TBE-Puffer</u>	108 g	Tris Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 Liter Wasser	
<u>10 x Proteinase K Puffer</u>	200 mM	Tris/HCl, (pH 8,0)
	1 mM	NaCl
	40 mM	EDTA (pH 8,0)
<u>6x Ladepuffer</u>	10 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	0,03%	Brompheholblau
	60%	Glycerin
	60 mM	EDTA (pH 8,0)
<u>ANE-Puffer</u>	10 mM	Natrium Acetat
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA (pH 8,0),
	die Lösung mit Essigsäure auf pH 6,0 einstellen	
<u>Chloropane 50%</u>	50%	Aqua-Phenol
	50%	Chloroform,

mit ANE-Puffer equilibrieren und in dunkler Flasche
bei 4°C lagern

Hypotonische Lösung

10 mM	Tris HCl, pH 8,4
50 mM	KCl
2,5 mM	MgCl ₂
4 mM	DTT
0,05%	SDS

LB-(Luria-Bertani)-Medium

1 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
1 %	NaCl

mit ca. 0,1 % .2 M NaOH auf pH = 7,5

Für Agarplatten zusätzlich:

1,2 %	Agar
-------	------

Lösung für Miller Protokoll

4M	Guanidinthiocyanat
0,5 %w/v	Na-sarcosinate
100 mM	β-Mercaptoethanol
ad 25 mM	Natrium-Citrat (pH 6,8)

Natrium-Acetat Puffer

50 mM	Na-Acetat
10 mM	EDTA (pH 8,0),

die Lösung mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen

10%	SDS
-----	-----

kurz vor der Anwendung dazu geben

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,5)

Lösung A

250 mM	Na ₂ HPO ₄
1,25 mM	NaCl
250 mM	NaH ₂ PO ₄

Lösung B

1,25 mM	NaCl
---------	------

Lösung B wurde zu Lösung A gegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht war.

3.1.7.2 Wasser

Für PCR-Reaktionen wurde autoklaviertes Reinstwasser nach Ultrafiltration (Milli-RO Plus 60, Millipore, Schwalbach) eingesetzt. Für Reaktionen mit RNA wurde steril filtriertes (Filter Millex GP Porendurchmesser 0,22 µm) Reinstwasser verwendet.

3.1.8. Sonstige Materialien

96-fach PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
Filter Millex GP Porendurchmesser 0,22 µm	Millipore Express, Irland
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
MicroSpin™G-25 Columns	Amersham Biosciences, Freiburg
Objektträger	Roth, Karlsruhe
PCR Gefäß 0,2 ml	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR Gefäßdeckel	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR Gummimatten	Perkin Elmer, Connecticut, USA
Reaktionsgefäße "safe lock" (2, 1,5, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
PP-Röhrchen, Cellstar®	Greiner GmbH, Frickenhausen
Spritze 20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Stericup und Steritop (PVDF 0,22 µm)	Millipore, Schwalbach
Transportgefäß Rotilabo (5 ml)	Karlsruhe, Roth
Zellkammer Neubauer improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen

3.1.9. Verwendete Software

Primer Express 2	Applied Biosystems, Darmstadt
------------------	-------------------------------

3.1.10. Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR

Die cDNA-Sequenz für das porcine PRM2 Gen wurde aus der NCBI-Datenbank entnommen (Accession-No. NM_214252).

cPRM2-298 se

5'-CAG AGG CTG CAG ACG GCAT C-3'

cPRM2-415 as

5'-GTT CCT GGC AGG TGA CTT TTT C-3'

Die DNA-Sequenz für das porcine PRM2 Gen wurde ebenfalls aus der NCBI-Datenbank entnommen (Accession-No. M80676).

dPRM2-294 se

5'-GCC CGT AAG CAA GTC ACT CAA C-3'

dPRM2- 599 as

5'-CCG CCC ATA GAA CGT GTC C-3'

3.1.11. Molekulargewichtstandards für DNA:

Lambda Eco RI Hind III Marker

MBI Fermentas, St. Leon Roth

pUC Mix Marker 8 (SM0301/2/3)

MBI Fermentas, St. Leon Roth

3.2. Methoden

3.2.1. Spermiovorbehandlung

Die Eberspermien für die Etablierung der RNA-Isolationsmethode wurden aus den institutseigenen Eberbeständen im Moorversuchsgut gewonnen. Die Spermien wurden auf Morphologie und Motilität untersucht. Es wurden nur die Ejakulate von normozoospermischen Spendern, bei denen mindestens 70% der Spermien

vorwärtsbeweglich waren, verwendet. Für die endgültigen Versuche wurden Spermiejakulate von vier geprüften Ebern aus der Schweineprüf- und Besamungsstation in Bergheim (86673 Bergheim) genommen.

3.2.1.1 Waschung und Verdünnung der Spermien

Die gewonnenen Spermien wurden mit 1 x PBS Lösung gewaschen. Der Waschvorgang wurde folgendermaßen durchgeführt:

Das Ejakulat (ohne das bulbourethrale Sekret) wurde in 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben 10 Min. bei 1.200 x g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Danach wurden die Spermien mit 1 x PBS resuspendiert und wieder auf 50 ml aufgefüllt. Die Waschung/Zentrifugation wurde drei Mal wiederholt. Die gewaschenen Spermien wurden gut durchgemischt und die Dichte wurde mit der Neubauer improved Kammer bestimmt. Alle Dichtebestimmungen wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Spermien}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Spermien in 1 } \mu\text{l}$$

Nach der Zählung wurden die Spermien in unterschiedlichen Konzentrationen (von 10 bis 500 Millionen) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Behandlung gelagert.

3.2.2. Umgang mit RNA-Proben

Die RNA ist eine instabile einzelsträngige Nukleinsäure und wird sehr schnell von endo- und exogenen RNasen abgebaut. Diese RNasen kommen ubiquitär (z.B. im Schweiß) vor, deswegen wurden Vorsichtsmaßnahmen vor/während und nach Arbeiten mit den sensiblen RNA-Proben getroffen:

- Tragen von Einmalhandschuhen
- Separaten Pipettensatz für RNA-Arbeiten

- Pipettenspitzen mit Filter
- Nur für RNA eingesetzte Plastikmaterialien und Chemikalien
- Separatem Laborarbeitsplatz für RNA-Arbeiten
- Regelmäßiges Reinigen des Arbeitsplatzes und der Pipetten
- „Backen“ von Glaswaren bei mindestens 180°C zum Zerstören von evtl. noch vorhandenen RNasen

Um die mRNA-Qualität und -Quantität in den Spermien so gut wie möglich zu erhalten, wurden frisch gewonnene Spermien sofort weiter verarbeitet. Wenn die RNA-Isolation nicht sofort erfolgte, wurden die Spermien in RNA*later* konserviert, mit dem die in Spermien vorhandene RNA stabilisiert und die RNasen blockiert wurden. Für den Transport und die Lagerung der Proben wurden optimale Bedingungen geschaffen (die Proben wurden auf Trockeneis transportiert, die Lagerung der Spermienproben und RNA-Isolate erfolgte bei -80°C).

3.2.3. Etablierung einer RNA-Isolationmethode

Um eine optimale Isolationmethode für RNA aus Eberspermien zu etablieren, wurden bereits publizierte Methoden zur Isolierung von Spermien-RNA anderer Tierarten (inklusive Mensch) angewendet. Zusätzlich wurden auch Isolationmethoden, die nicht zur Spermien-RNA-Isolierung beschrieben waren, adaptiert.

3.2.4. Vorversuche

Da es in der Literatur bei manchen Methoden meist keine genauen Angaben über die verwendete Spermienanzahl gab, wurden zuerst systematisch RNA-Isolationen mit ansteigenden Konzentrationen (10, 25, 50, 75, 100 und 500 Millionen Spermien pro Probe) durchgeführt. Ebenso wurde die Menge an TriZol der Spermienkonzentration angepaßt. Das TriZol-Volumen durfte nicht zu gering sein, da es so zu DNA- und/oder Proteinkontamination durch Handlingprobleme führte. Aber auch nicht zu groß, da sonst ein Teil der RNA verloren ging (Verdünnungseffekt).

Außerdem wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt zu Beginn der Isolation eingeführt, um Zelltrümmer zu entfernen und auch spätere Kontaminationen zu vermeiden. Dieser zusätzliche Zentrifugationsschritt war wichtig, da ohne Abtrennung der Zelltrümmer keine brauchbare RNA gewonnen wurde (DNA- und Proteinkontaminationen).

Da die absolute RNA-Menge in Spermien deutlich niedriger als in somatischen Zellen ist, wurde die Zeitdauer einiger Schritte im Isolierungsprotokoll verlängert. So wurde die RNA-Fällung bei Raumtemperatur von 5 auf 15 Min. und die anschließende Zentrifugation von 10 auf 30 Min. verlängert.

Um die Fällung geringer RNA-Mengen zu optimieren, wurden mehrere Fällhilfen ausprobiert. Es wurde der Einfluss der Fällhilfen Glykogen, Natrium-Acetat, Glykogen mit Natrium-Acetat und seeDNA untersucht.

Die Ziele bei den Vorversuchen waren die Etablierung eines RNA-Isolationsprotokolls, das eine hohe RNA-Ausbeute bei gleichzeitig niedriger Kontamination durch genomische DNA ermöglichte. Daneben sollte die Qualität der isolierten RNA gut sein. Um diese Parameter zu überprüfen wurde die RNA sowohl durch „klassische“ Agarosegelelektrophorese, als auch durch die Anwendung der quantitativen Real-Time PCR kontrolliert und dokumentiert.

3.2.5. Isolationsmethoden

Für den endgültigen Vergleich der Isolationsmethoden wurden je 10 Millionen Spermien von 4 Ebern im Doppelansatz untersucht. Abhängig von der Isolationsmethode wurden entweder die mitgelieferten Fertigpräparate angewendet oder die Lösungen wurden selbst hergestellt. Um die weiteren Untersuchungen vergleichbar durchführen zu können, wurden alle RNA-Isolate im gleichen Volumen (16 µl) Wasser gelöst. Nach der Isolation wurden die Proben geteilt (jeweils 8 µl). Eine Probe wurde mit 2 µl Wasser bis auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, die andere Probe wurde einem DNaseI Verdau unterzogen (das Gesamtvolumen betrug danach

ebenfalls 10 µl). Alle Proben wurden direkt nach der RNA-Isolierung in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben.

Folgende Protokolle wurden durchgeführt:

- TriZol Protokoll
- Douglas Protokoll
- Hot-Phenol Protokoll
- Miller Protokoll
- RNA-Pure Protokoll
- RNeasy-kit Protokoll
- SDS-DTT-Proteinase K Vorbehandlung + TriZol

Alle Proben wurden bei 4°C zentrifugiert, außer es ist anders vermerkt. Die Proben von 4 Ebern mit jeweils 10 Millionen Spermien wurden im Doppelansatz untersucht. Die Spermien wurden auf Eis ca. 30 Minuten aufgetaut. Danach wurden die Spermien 5 Minuten bei 750 x g zentrifugiert, und der Überstand wurde abpipettiert. Zur Elimination somatischer Zellen in den Proben wurden die Pellets mit 0,5% Triton X-100 in hypotonischer Lösung resuspendiert und für 10 Min. auf Eis inkubiert (außer es ist anders vermerkt). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand verworfen.

3.2.5.1 TriZol Protokoll

TriZol ist ein kommerziell erhältliches Präparat der Fa. Invitrogen. TriZol ist eine einphasige Mischung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol. Das konventionelle Protokoll wurde den Anforderungen der RNA-Isolation aus den Vorversuchen angepasst.

Zum Pellet aus 10 Millionen Spermien wurde jeweils 800 µl TriZol Reagenz dazugegeben. Um Kontaminationen und RNA-Verluste zu vermeiden, wurden die Proben nicht, wie bei Organproben üblich, mit einem Stabhomogenisator homogenisiert, sondern für 30 Sek. auf höchster Stufe gevortext. Danach wurden die

Proben für 10 Min. bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Um die Zelltrümmer zu entfernen wurden die Spermien für 10 Min. bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 790 µl) wurde vorsichtig mit der Pipette in ein anderes 1,5 ml Tube pipettiert. Es wurden 0,2 Volumen (158 µl) kaltes Chloroform (4°C) zu den Proben gegeben, 20 Sek. auf höchster Stufe gevortext und für 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 15 Min. bei 12.000 x g sind drei Phasen im Tube sichtbar. Die obere wässrige Phase enthält die RNA, die mittlere „Interphase“ besteht aus DNA und die untere organische Phase aus Proteinen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig, ohne „Aufsaugen“ der unteren Schichten, in ein neues 1,5 ml Tube pipettiert. Für die bessere Fällung der RNA wurde zu den Proben Glykogen (je 1 µl pro Tube) und Natrium-Acetat (3 M, pH 5,3) dazugegeben. Zum Überstand wurde die gleiche Menge (1 Volumen) kaltes Isopropanol (4°C) gegeben und die Proben durch vorsichtiges Drehen der Tubes gemischt. Da es sich um geringe RNA-Mengen handelt, wurde die Zeit der Fällung (auf 15 Min. bei RT) und die Zentrifugation (auf 30 Min. bei 15.000 x g) verlängert. Die RNA wurde mit 4°C kaltem Ethanol (75%) gewaschen, die Proben durch Vortexen gemischt und anschließend 5 Min. bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. Die Tubes wurden zum Abtropfen umgekippt und danach noch ganz kurz zentrifugiert, um den restlichen Ethanol abpipettieren zu können. Das Pellet wurde unter einem Abzug getrocknet (Dauer ca. 5 Min.). Nach der Trocknung wurde das Pellet in 16 µl Wasser bei 55°C für 3 Min. gelöst.

3.2.5.2 Douglas Protokoll

Diese Methode wurde von Krebs und Favor (1997) beschrieben, die sowohl DNA als auch RNA aus Mäusespermien isolierten. Die genaue Spermienkonzentration wurde im Protokoll nicht erwähnt, aus diesem Grund mussten die Volumen der Reagenzien der Spermienkonzentration angepasst werden (siehe oben, TriZol-Protokoll). Außerdem wurden nicht alle Angaben im Protokoll (z.B. Zeit der Behandlungen, Menge der Reagenzien, Einstellungen der Zentrifuge etc.) genau beschrieben. Dementsprechend wurden alle diese Punkte neu erarbeitet und die Ergebnisse mittels Gelelektrophorese und qPCR untersucht und die beste Kombination ermittelt.

Die Phenol-Chloroform Isolation wurde durch die oben beschriebene TriZol-Chloroform Isolation ersetzt.

Das Pellet der zuvor zentrifugierten Proben (siehe 3.2.3.2) wurde mit 30 µl 10%igem SDS resuspendiert und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 1 ml 1 x PBS zweimal gewaschen (bei 2.500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen). Nach dem zweiten Waschgang wurde das Spermienpellet mit 100 µl hypotonischer Lösung resuspendiert und 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) dazu gegeben und zwei Stunden bei 55°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lysis Puffer (4 M Guanidinisothiocyanat in 25 mM Na-Citrat pH 6,8, mit 0,5%w/v Na-sarcosinat), 10 µl NaCl (3 M), 15 µl Proteinase K und 3 µl 10%iges SDS dazu pipettiert, gemischt und für weitere 1,5 Stunden bei 42°C im Schüttler inkubiert. Das Gesamtvolumen der Probe betrug nun 293 µl. Für ein besseres Handling wurden die Proben auf zwei Tubes verteilt (je 146,5 µl). Zu jedem Tube wurde anschließend 1,35 ml TriZol-Reagenz dazu gegeben, danach erfolgte die oben beschriebene TriZol-Isolationsmethode (3.2.3.2).

3.2.5.3 Hot-Phenol Protokoll

Diese Methode wurde von Köhrer und Domdey (1991) etabliert, mit der RNA aus Hefen isoliert wurde. Für sehr große Hefemenge (3-4 g) wurden im Protokoll die entsprechend hohen Mengen an Reagenzien und Lösungen benötigt. Für die RNA-Isolation aus den Spermien wurden diese reduziert. Die Spermien (von 10 bis 500 Millionen) wurden mit der gleiche Reagenzienmenge behandelt. Die isolierten Produkte wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese miteinander verglichen und es wurde die Spermienkonzentration als optimal angesehen bei der keine DNA-Kontaminationen sichtbar waren.

Das Pellet mit 10 Millionen Spermien wurde mit 450 µl Natrium-Acetat Puffer resuspendiert. Dazu wurde 0,1 Volumen (45 µl) 10% SDS und 1,1 Volumen (495 µl) heißes Phenol (65°C) dazugegeben. Die Proben wurden sofort im 65°C heißen Wasserbad für 5 Min. inkubiert, dabei wurden die Tubes alle 30 Sek. bei RT kurz

gevortext (alles unter einem Abzug). Anschließend wurden die Proben kurz in einem Eis-Ethanol Bad abgekühlt und bei $2.500 \times g$ für 10 Min. bei RT zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit der Pipette entfernt. Zu der erhaltenen wässrigen Phase mit Interphase und Zelltrümmern wurde 495 μ l Hot-Phenol dazugegeben. Die Inkubation im Wasserbad wurde wiederholt. Die Proben wurden 15 Min. bei $12.000 \times g$ bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nun in ein neues Tube pipettiert. Dazu wurde 1 Volumen Chloroform gegeben, 2 Min. gevortext und 10 Min. bei $12.000 \times g$ bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und das gleiche Volumen an Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) dazugegeben. Anschließend wurden die Tubes gevortext und 10 Min. bei $12.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (maximal 350 μ l pro 1,5 ml Tube) wurde vorsichtig abpipettiert. Danach wurde 0,1 Volumen Natrium-Acetat (3 M, pH 5,3) und 3 Volumen 100%iges Ethanol dazugegeben, gemischt und eine Stunde bei RT gefällt. Die Tubes wurden 30 Min. bei $25.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und mit 1 ml 75%iges Ethanol gewaschen. Das Pellet nach dem Zentrifugationsschritt (5 Min. bei $12.000 \times g$ und 4°C) wurde unter einem Abzug getrocknet und mit 16 μ l Wasser bei 55°C für 3 Min. gelöst.

3.2.5.4 Miller Protokoll

Diese Isolationsmethode wurde von Miller et al. (1994) beschrieben, um RNA aus Humanspermien zu isolieren. Um diese Methode durchführen zu können, sollte eine Lösung vorbereitet werden. Diese Lösung wurde als „Miller-Lösung“ bezeichnet. Zum ursprünglichem Protokoll wurde eine Waschung der Spermien mit 75%igem Ethanol eingefügt.

Die Spermien wurden mit 1 x PBS gewaschen und abzentrifugiert und nach der Zentrifugation das Pellet in 1,5 ml sterilem destillierten Wasser mit 0,1% SDS und 0,5% Triton X resuspendiert und für 15 Min. auf Eis gestellt. Es erfolgte eine Zugabe von 150 μ l 10 x PBS und die Tubes wurden für 5 Min. bei $1.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde mit 400 μ l „Miller-Lösung“ resuspendiert und für 30 Min. bei 65°C inkubiert. Für die bessere Fällung der RNA

wurde Glykogen (1 µg/ml) dazu gegeben. Nach der Inkubation wurden 800 µl Phenol, das mit Natrium-Citrat pH 6,8 (25 mM) äquilibriert war, dazu pipettiert und die Tubes für 20 Sek. gevortext. Die Phasentrennung wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen Chloroform erreicht. Die Tubes wurden gevortext und für 15 Min. bei 14.000 x g zentrifugiert. Die wässrige obere Phase (ca. 500 µl pro 1,5 ml Tube) wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Tube überführt. Dazu wurde 0,1 Volumen Natrium-Acetat (3 M) und 2 Volumen 100%iges Ethanol (4°C) beigemischt. Die Tubes wurden für 20 Min. bei 14.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen (5 Min. bei 12.000 x g) und unter dem Abzug für ca. 5 Min. getrocknet. Das Pellet wurde in 16 µl Wasser bei 55°C für 3 Min. gelöst.

3.2.5.5 RNA-Pure Protokoll

RNA-Pure ist ein kommerziell erhältliches Präparat der Fa. PeqLab. Das Herstellerprotokoll wurde nur geringfügig geändert und an die RNA-Isolation der Eberspermien angepasst. Bei der Optimierung des Protokolls wurden die gleichen Parameter verändert wie beim TriZol Protokoll (siehe 3.2.3.2).

Das Pellet aus 10 Millionen Spermien wurde sofort mit 800 µl RNA-Pure aufgefüllt und die Tubes für 30 Sek. auf höchster Stufe gevortext. Anschließend wurden die Tubes für 10 Min. bei RT stehen gelassen. Die Zelltrümmer wurden durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt (10 Min. bei 12.000 x g) und Abpipettieren des Überstandes in ein neues Tube (1,5 ml) entfernt. Zum Überstand wurden 0,2 Volumen Chloroform (4°C) gegeben, für 20 Sek. gevortext und für 10 Min. bei RT stehen gelassen. Nach 15 Min. Zentrifugation bei 12.000 x g wurde die wässrige obere Phase vorsichtig in ein neues Tube pipettiert. Dazu wurde 1 µl Glykogen, 0,1 Volumen Natrium-Acetat (3 M) und 1 Volumen Isopropanol (4°C) gegeben und vorsichtig durch mehrmaliges Kippen des Tubes gemischt. Danach wurden die Proben für 15 Min. bei RT stehen gelassen. Die Proben wurden bei 15.000 x g für 30 Min. gefällt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 75%igem Ethanol (4°C) gewaschen. Das Pellet wurde unter einem Abzug getrocknet und in 16 µl Wasser bei 55°C für 3 Min. gelöst.

3.2.5.6 RNeasy Mini Kit

RNeasy Mini Kit ist ein Protokoll zur RNA Isolierung aus Geweben und Zellkulturen. Es wurde mit kleinen Veränderungen durchgeführt (Ostermeier et al., 2005). Die Spermien wurden in 600 µl Lysis-Puffer (RLT, enthält Guanidinthiocyanat, wurde vor dem Gebrauch mit β -Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 versetzt) resuspendiert. Die Lösung mit den Spermien wurde mehrfach durch eine Nadel (Dicke 26) gezogen und danach bei 65°C für 30 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Spermien noch mal mit der Nadel homogenisiert. Anschließend wurde 1 Volumen (600 µl) 70%iges Ethanol dazu pipettiert und gemischt. Die lysierten Proben (ca. 700 µl) wurden auf die RNeasy Mini-Säulen pipettiert und für 15 Sek. bei 8.000 x g zentrifugiert und das abzentrifugierte Lysat wurde verworfen. Der Rest der lysierten Proben (500 µl) wurde auf die gleiche Säule pipettiert und auf gleiche Weise behandelt. Danach wurde 700 µl RW1-Puffer (Waschpuffer, enthält Ethanol) auf die Säulen pipettiert und die Säulen für 15 Sek. bei 8.000 x g zentrifugiert. Die Säulen wurden auf ein neues Tube (2 ml) gesetzt. Anschließend wurde zweimal jeweils 500 µl RPE-Puffer (Waschkonzentrat, wurde vor dem Gebrauch mit 100%igem Ethanol im Verhältnis 1:4 verdünnt) dazu pipettiert und für 15 Sek. bei 8.000 x g zentrifugiert. Danach wurde RPE-Puffer, der noch auf den Säulen geblieben ist, durch Zentrifugation (eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit) entfernt. Die Säulen wurden auf ein neues 1,5 ml Tube gesteckt. Die RNA wurde zweimal mit jeweils 50 µl Wasser für 1 Min. bei 8.000 x g eluiert. Das Gesamtvolumen der RNA-Lösung betrug 100 µl. Anschließend wurde eine Fällung mit 100 µl Isopropanol mit anschließender Zentrifugation durchgeführt, um die Menge des RNA-Isolats auf 16 µl zu reduzieren.

3.2.5.7 SDS-DTT-Proteinase K Vorbehandlung

Das Spermienpellet aus 10 Millionen Spermien wurde mit 80 µl 1 x Proteinase K Puffer resuspendiert und 3 µl 10%iges SDS und 2 µl DTT (0,1 M) dazugegeben und gemischt. Die Tubes wurden eine Stunde bei 65°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) dazugegeben und noch mal für

eine Stunde bei 55°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Isolation mit 1 ml TriZol Reagenz durchgeführt (3.2.3.2). Das RNA-Pellet wurde in 16 µl Wasser bei 55°C für 3 Min. gelöst.

3.2.6. Durchführung der quantitativen Real-Time PCR

3.2.6.1 Dnase I Verdau

Die zweite Hälfte jeder Probe wurde einer Deoxyribonuklease I (DNase I) Behandlung unterzogen. Das Ziel war, eine mögliche Kontamination mit DNA in den Proben zu beseitigen, um möglichst reine RNA zu erhalten. Zu den 8 µl RNA-Isolat wurden 0,5 µl DNase I (1 U/µl) und 1 µl 10x DNase I Puffer pipettiert, gemischt und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase I wurde mit 0,5 µl EDTA (25 mM) und 10 Min. Inkubation bei 65°C zerstört. Das Gesamtvolumen der DNase-verdauten Proben betrug somit 10 µl.

3.2.6.2 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) wurde die SuperScript II reverse Transkriptase benutzt, die eine Weiterentwicklung der klassischen M-MLV reversen Transkriptase ist und im Gegensatz zur dieser eine reduzierte RNaseH Aktivität, eine erhöhte thermische Stabilität und eine höhere Spezifität besitzt. Die Erstrangsynthese wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, nur die Umschreibungszeit wurde von 50 auf 90 Minuten erhöht und die Konzentration der Superscript II RT reduziert (von 200 auf 50 U/µl).

Menge und Art der verwendeten Reagenzien:

10 µl	RNA
1 µl	dNTPs, 10mM (je 10 mmol/l dGTP, dATP, dCTP, dTTP)
1 µl	Random Hexamer Primer (3 µg/µl)
4 µl	5 x Erststrang Puffer
2 µl	DTT (100 mM)
1 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl)
0,25 µl	SuperScript II RT (50 U/µl)
0,75 µl	H ₂ O

20 µl	Gesamtvolumen
-------	---------------

Für die Erstrangsynthese wurde das gesamte RNA-Isolat eingesetzt (10 µl). Da bis zu 16 Proben gleichzeitig umgeschrieben werden sollten, wurden für den besseren Umgang und Vergleichbarmachung der Reaktionsbedingungen drei Mastermixe vorbereitet.

1. Mastermix (MM1)

1 µl	Random Hexamer Primer
1 µl	10 mM dNTPs
0,75	µl Wasser
(2,75 µl insgesamt)	

2. Mastermix (MM2)

3 µl	5 x Erststrang-Puffer
2 µl	DTT
1 µl	RNase Inhibitor
(6 µl insgesamt)	

3. Mastermix (MM3)

1 µl 5x Puffer
0,25 µl SuperScript II Reverse Transkriptase
(1,25 µl insgesamt)

Zu den 10 µl RNA-Isolat wurde MM1 (2,75 µl) dazu gegeben und die Proben bei 65°C für 5 Min. inkubiert. In diesem Schritt wurden die Sekundärstrukturen der RNAs denaturiert. Danach wurden die Tubes schnell auf Eis gestellt und MM2 (6 µl) dazu pipettiert und für 10 Min. bei RT stehen gelassen. In diesem Schritt lagern sich die Random Hexamer Primer an die RNA-Moleküle an. Die Tubes wurden anschließend bei 42°C für 2 Min. inkubiert, bevor der MM3 (1,25 µl) dazu gegeben wurde. Anschließend wurden die Tubes für 90 Min. bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der SuperScript II Reverse Transkriptase erfolgte durch eine Hitzebehandlung (15 Min. bei 75°C). Die Tubes wurden auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und aliquotiert (je 6,6 µl) und bei –80°C bis zur qPCR gelagert.

3.2.6.3 Quantitative PCR

Die cDNA wurde mittels der quantitativen PCR (qPCR) untersucht. Die klassische PCR erfolgt in drei Schritten:

Denaturierung	die DNA-Stränge werden von einander getrennt
Hybridisierung (<i>annealing</i>)	die Primer lagern sich an
Synthese (<i>elongation</i>)	die DNA-Polymerase synthetisiert zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitte einen neuen komplementären Einzelstrang.

Die nächste Denaturierung trennt die Stränge wieder voneinander und ein weiterer PCR-Zyklus folgt.

Im Gegensatz zur quantitativen Real-Time PCR kann bei der klassischen Block-PCR keine sichere Aussage über die eingesetzte Probenmenge getroffen werden, da die

Produkte erst nach Beendigung der PCR untersucht werden können (Endpunkt-PCR Analyse). Die Reaktion befindet sich bei der Endpunkt-Analyse schon in der sogenannten Plateau-Phase, bei der keine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz mehr stattfindet und somit die Aussagekraft über die eingesetzte Probenmenge nicht gegeben ist.

Die Grundlage für die qPCR wurde von Higuchi et al. (1992) etabliert. Bei der Real-Time PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (SYBR-Green I) verwendet, der an die amplifizierte DNA binden kann. Die gemessene Fluoreszenz steigt proportional zur PCR-Produktmenge an und wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen (Real-Time). Die Detektionssysteme bestehen aus einem klassischen PCR-Cycler und einem optischen Detektionsmodul. Über dieses System wird nach jedem PCR-Zyklus die eventuelle Zunahme der Fluoreszenz gemessen.

Die Kopienzahl der cDNA- und DNA-spezifischen Amplifikationen wurde mittels eines Plasmidstandards bestimmt und erlaubte so eine Vergleichbarkeit der isolierten und umgeschriebenen Proben anhand absoluter Zahlen. Für jedes Primerpaar wurde ein Plasmidstandard erstellt. Dazu wurden zuvor erstellte PCR-Produkte der Zielsequenzen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und beurteilt, ob die Sequenzen die richtige Produktlänge haben. Anschließend wurden diese PCR-Produkte in den TOPO Cloning PCR Kit nach Herstellerangaben kloniert. Die Klone wurden auf Agarplatten (mit Ampicillin) verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium wieder über Nacht bei 37°C in einem Schüttler kultiviert. Die Plasmide wurden aus den Bakterien mit dem Plasmid Purification Kit nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurden die Plasmide mit XHO I linearisiert und eine zweite Probe wurde mit EcoR I behandelt, um die klonierte Sequenz auszuschneiden. Von beiden Proben wurden 3 µl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und der Einbau des PCR-Produktes (EcoR I Proben) und die vollständige Linearisierung des Plasmids (XHO I Proben) kontrolliert. Die Proben, die das PCR-Produkt enthielten und vollständig linearisiert waren, wurden auf 1 Million Kopien pro µl verdünnt und der

Einbau der richtigen Sequenz durch die Sequenzierabteilung des Genzentrums (Laboratorium für funktionale Genomanalyse, LAFUGA) bestätigt.

3.2.6.4 Primerdesign

Die Primer wurden mit Hilfe der Computersoftware Primer Express 2 konstruiert. Die ausgesuchten Primerpaare wurden in der Syntheseabteilung des Genzentrums der LMU München synthetisiert. Für die Untersuchung des Spermien RNA-Gehaltes wurde das Gen PRM2 gewählt, da diese RNA nur in Spermien und Hoden vorkommt und die Sequenz beim Schwein vollständig bekannt war. Die cDNA-spezifischen Primer wurden so kreiert, dass mindestens ein Primer auf einer Exon-Exon Grenze lag und somit nur ein cDNA-spezifisches Produkt zuließ. Diese cDNA-Spezifität des PRM2 wurde mittels klassischer PCR bestimmt, bei PCR-Tubes mit entweder cDNA- oder DNA-Proben in die Reaktion eingesetzt wurden und nur die Proben mit cDNA ein PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese aufwiesen. Ebenso wurden für die Untersuchung der möglichen DNA-Kontamination DNA-spezifische Primer kreiert, bei denen mindestens ein Primer in das Intron zwischen zwei Exons gelegt wurde. Die DNA-Spezifität der Primer wurde wie oben beschrieben für die DNA-Spezifität untersucht.

3.2.6.5 Durchführung der qPCR

Es wurden die Parameter RNA-Ausbeute, RNA-Reinheit (und DNA-Kontamination) mit den cDNA- (cPRM2-298se/415as) und DNA- (dPRM2-294se/599as) spezifischen Primern untersucht. Die cDNA wurde auf Eis aufgetaut und der PCR-Mastermix dazu pipettiert. Beim Herstellen des Mastermix mußte beachtet werden, dass die Reagenzien SYBR-Green I und ROX lichtempfindlich sind. Deswegen musste der Mastermix erst kurz vor der Anwendung pipettiert.

Mastermix 1:

Menge (µl)	Reagenz	Finalkonzentration pro µl
2,5	Puffer B (10x)	1 x
2,5	dNTPs (2 mM)	0,2 mM
4	MgCl ₂ (25 mM)	4 mM
1,5	Primer se (5 µM)	300 nM
1,5	Primer as (5 µM)	300 nM
0,125	Uracil-N-Glycosidase (1 U/µl)	0,01 U
0,5	SYBR-Green I (10x)	0,2 x
0,5	ROX (25 µM)	1 µM
0,2	HotFirePol Taq (5 U/µl)	0,04 U
9,675	Wasser	
2	cDNA	
25	Gesamtvolumen	

Mastermix 2:

	6,6 µl	Probe
+	75,9 µl	MasterMix 1
=	82,5 µl	Gesamtvolumen pro Triplikat

Der Mastermix 2 wurde mit der Pipette gemischt und pro Well je 25 µl (Triplikatansatz) pipettiert. In jeder qPCR Reaktionsplatte (96-Lochplatte) wurde eine sogenannte non-template-control (NTC, Mastermix ohne Probe) miteinbezogen, d.h. es wurde eine mögliche Kontamination des Mastermixes 1 bei jedem einzelnen PCR-Lauf überprüft. Eine minus RT-Probe (Probe bei der in der Umschreibungsreaktion keine reverse Transkriptase enthalten war), wurde nicht eingesetzt, da die Primer cDNA-spezifisch waren. Die 96 Well-Platte für die PCR wurde mit einer fluoreszenzdurchlässigen, selbstklebenden Folie verschlossen und kurz

abzentrifugiert, um einerseits störende Luftblasen zu vermeiden und andererseits die Reaktionslösung auf den Tubeboden zu bringen.

PCR-Programm für die qPCR:

2 Min.	50°C	Zerstörung von Carry-over Kontaminationen (Uracil-N-Glycosidase verdaut doppelsträngige PCR-Produkte, in denen zuvor dUTP eingebaut wurde)
15 Min.	95°C	Aktivierung der Taq-Polymerase
15 Sek.	95°C	Denaturierung
60 Sek.	60°C	Annealing und Elongation (Wiederholung der letzten beiden
Schritte insgesamt 40 Zyklen)		

Nach Beendigung der PCR-Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse der PCR durchgeführt, um eine eventuelle Primerdimer-Bildung (Selbstamplifikation von Primern, ist auch ohne Probe in der Reaktion möglich) auszuschließen. Nach Ende der PCR-Reaktion wurden die Platten beschriftet und bei -20°C bis zur Gelelektrophorese gelagert.

3.2.6.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe im elektrischen Feld. Unter Verwendung einer konstanten Gleichstromspannung wandern die elektrisch geladenen Teilchen im Gel von der Kathode zur Anode. Dabei kommen kleine negativ geladene Fragmente schneller voran, als größere negativ geladene.

Für die Kontrolle der PCR-Produkte wurde ein 2%iges Agarosegel angefertigt. Nach Abwiegen der Agarose wurde 1 x TBE (Tris/Borsäure/EDTA) Puffer dazugegeben und die Agarose in der Mikrowelle aufgekocht. Die Lösung wurde unter ständigem Schwenken auf ca. 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt und in eine Gelträger-Form mit Plastikkamm für die Geltaschen gegossen. Nach Erstarren

des Gels wurde in die Gelkammer 1 x TBE Laufpuffer gegeben bis das Gel vollständig von Puffer bedeckt war.

Die PCR-Produkte wurden aufgetaut und mit 6 x Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. In die erste und die letzte Tasche wurde jeweils der Längenstandard (pUC Mix Marker 8) gegeben. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte unter 5 V/cm Spannung und 90 Min. Dauer.

Für die RNA-Isolate wurden 1%ige Gele vorbereitet. Die Utensilien (Gelkammer, Gelschlitten, Kämme) für die Elektrophorese wurden in 3%igem SDS eingeweicht und mit destilliertem Wasser gewaschen, um mögliche RNasen zu zerstören. Als Längenstandards wurden pUC Mix Marker 8 und Lambda Eco RI Hind III Marker verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte unter 5 V/cm Spannung und 90 Min. Dauer. Das Gel wurde mit dem UV-Leuchttisch (Fa. BioRad) fotografisch dokumentiert und anschließend mit GelDoc (Fa. BioRad) ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Vorversuche

Eine erfolgreiche RNA-Isolierung war schon makroskopisch an den sichtbaren Eigenschaften des RNA-Pellets erkennbar. Ein kleines und gleichmäßig weißes Pellet deutete auf eine hohe RNA-Quantität mit geringen Kontaminationen an DNA oder Proteinen hin. Wenn das Pellet hingegen groß und inhomogen (milchig-flockig) war, ließ es sich auch nur schwer in Wasser lösen. Beim Vorliegen eines solchen Pellets war entweder die Menge an Isolierungsreagenz zu gering bemessen oder beim Abpipettieren der oberen wässrigen Phase wurde die Interphase (mit DNA) mitgenommen (dieses Pellet musste nochmals dem TriZol-Protokoll unterzogen werden, was aber mit RNA-Verlusten verbunden war).

Die Beurteilung der RNA erfolgte mittels Gelelektrophorese. Gesamt-RNA, die aus Spermien isoliert wurde, zeigte einen langgezogenen „RNA-Schmier“ auf dem Agarosegel (Abb. 5a) ohne typischen Banden der ribosomalen RNAs. Dieser „RNA-Schmier“ nach der TriZol-Isolierungsmethode wurde allerdings erst ab einer Spermienausgangskonzentration von ca. 50 Millionen sichtbar. Die Qualitätsbeurteilung der Gesamt-RNA, die aus Organgeweben isoliert wurde, erfolgt am Verhältnis von 18S zu 28S-rRNA, da die ribosomale RNA zu ca. 80% in somatischen Geweben vorkommt und nur aus vier (5S; 5,8S; 18S und 28S) RNAs besteht (Abb. 6). Wichtig bei der Beurteilung der Gesamt-RNA aus Spermien ist es auch, eine mögliche Kontamination durch genomische DNA auszuschließen. Eine hohe Kontamination ist sichtbar durch DNA in den Taschen des Agarosegels (Abb. 5b). Eine geringe Kontamination mit genomischer DNA ist durch die Gelelektrophorese nicht zu erfassen. Hierfür bietet sich beispielsweise eine weitere Untersuchung der RNA-Qualität und -Quantität mittels qPCR an.

Bei der Evaluierung der TriZol-Extraktionsmethode zeigte sich, dass für 100 Millionen Spermien mindestens 3,2 ml, für 50 Millionen mindestens 1,6 ml und für 10 Millionen Spermien 800 µl TriZol-Reagenz benötigt wurden (Abb. 5a). Das RNA-

Pellet ist bei diesem Verhältnis klein und gleichmäßig weiss (siehe oben). DNA-Kontaminationen sind nicht mehr auf dem Agarosegel erkennbar (Abb. 5a, Spur 3 und 4). Nach der Isolierung der RNA aus 500 Mio. Spermien unter optimierten Bedingungen war 1/10 der isolierten Gesamt-RNA ausreichend, um auf dem Geldokumentationsbild einen deutlichen „RNA-Schmier“ zu zeigen. Dieser Schmier resultierte nicht aus DNA-Fragmenten, wie die Untersuchungen mit DNase I zeigten (Abb. 5a, Spur 3 und 4). Der „RNA-Schmier“ wird so aus unterschiedlich langen RNAs gebildet. Dieser lang gezogene „Schmier“ auf dem Gelbild war für die isolierte Gesamt-RNA aus Eberspermien typisch (Abb. 5a).

Wenn die Isolierungsreagenzien nicht optimiert wurden, war auch ein deutlicher „Schmier“ sichtbar (Abb. 7a und b), der aber im hochmolekularen Bereich lag und sich somit vom typischen „RNA-Schmier“ (siehe Abb. 5a) unterschied. Die weitere Untersuchung des Isolats mit einem RNaseA (Abb. 7b) und einem DNase (Abb. 7c) Verdauungsschritt zeigte deutlich, dass der „Schmier“ aus DNA bestand. Für die weiteren Versuche wurde die Spermienkonzentration auf ca. 10 Millionen Spermien pro Probe reduziert.

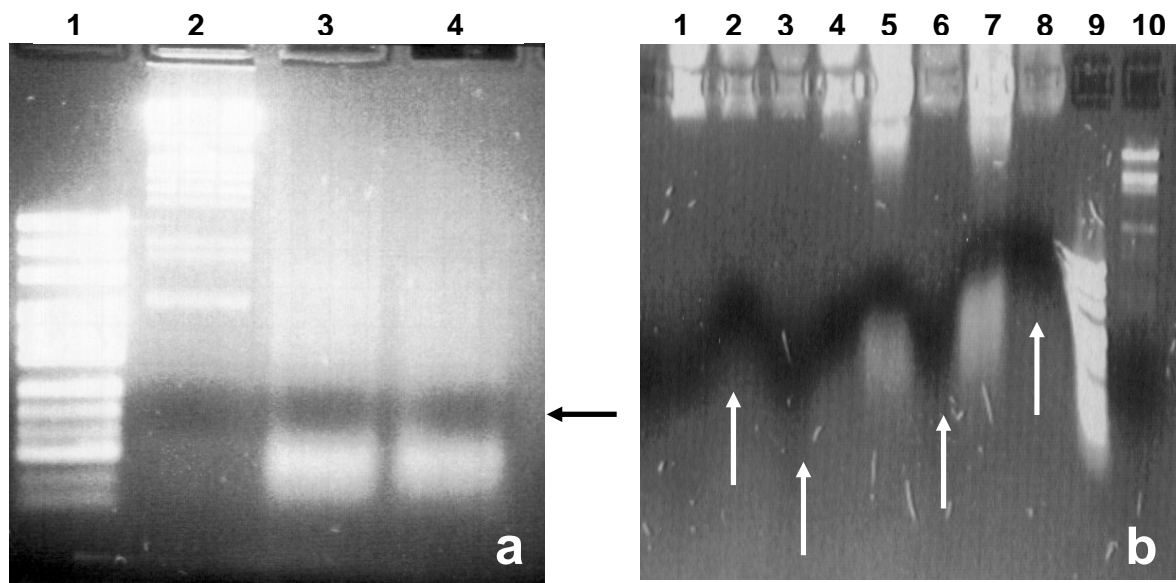


Abb. 5:

Gelelektrophorese der Gesamt-RNA aus Eberspermien, die mit der TriZol Methode isoliert wurde. Sichtbar ist die Gesamt-RNA aus Spermien, die mit einer optimierten (a) und einer nicht optimierten (b) TriZol-Menge isoliert wurden.

- a** Gelelektrophorese der Gesamt-RNA aus 150 Millionen Spermien. Im „RNA-Schmier“ sind keine ribosomalen RNA-Banden sichtbar. Der schwarze Pfeil zeigt die schwache Bande des Bromphenols im Ladepuffer, der bei der Geldokumentation unter UV-Licht dunkel erscheint.

Spur 1	Marker pUC8
Spur 2	Marker λ EcoRI
Spur 3	1/10 des RNA-Isolats
Spur 4	1/10 des RNA-Isolats nach DNase I Verdau

- b** Gelelektrophorese der Gesamt-RNA aus 150 Millionen Spermien. Die weißen Pfeile zeigen den unregelmäßigen Verlauf der Ladepuffer Bande. Die Geltaschen sind hellweiß und deuten auf eine Verunreinigung mit DNA und/oder Proteinen hin.

Spuren 1 bis 4	RNA-Isolat aus 150 Millionen Spermien
Spuren 5 bis 8	RNA-Isolat aus 500 Millionen Spermien
Spur 9	Marker pUC8
Spur 10	Marker λ EcoRI

Im Vergleich dazu wurde die Gesamt-RNA, die aus Eberhoden gewonnen wurde, auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 6). Die Gesamt-RNA zeigt die typischen Banden der 5S, 18S und 28S ribosomalen RNA.

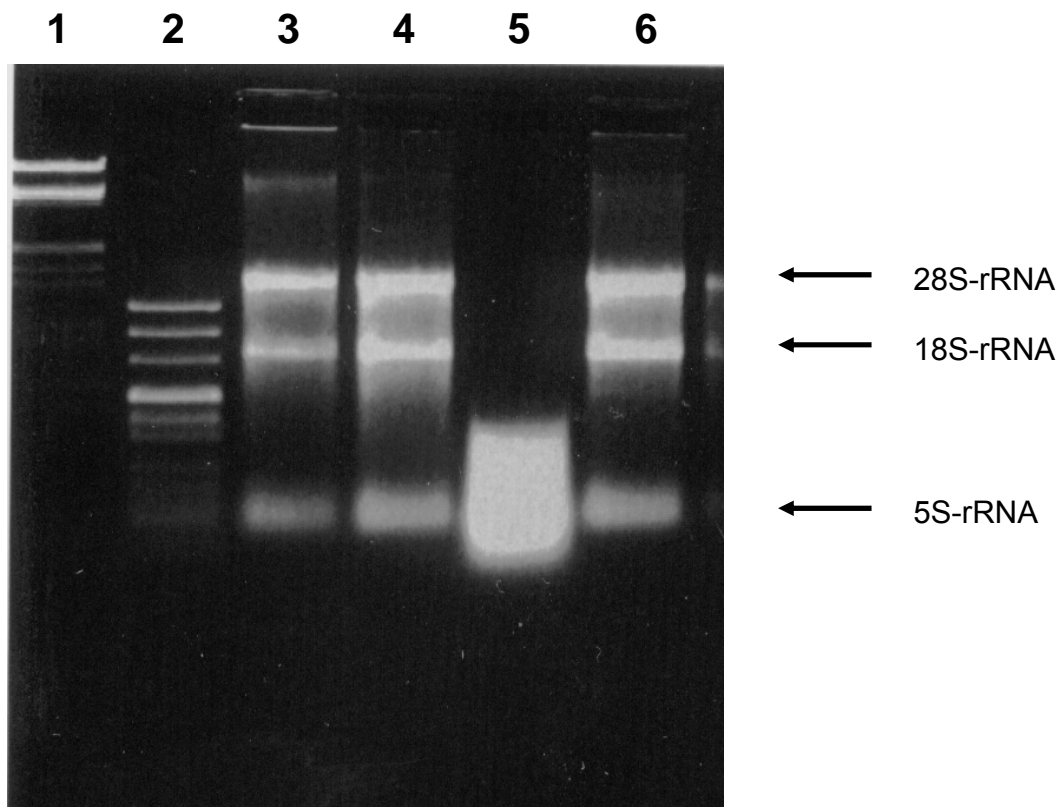


Abb. 6:

Gelelektrophorese der Gesamt-RNA, die aus Hodengewebe mit der TriZol Methode isoliert wurde.

Spur 1	Marker λ EcoRI
Spur 2	Marker pUC8
Spuren 3, 4, 6	intakte RNA
Spur 5	degradierte RNA

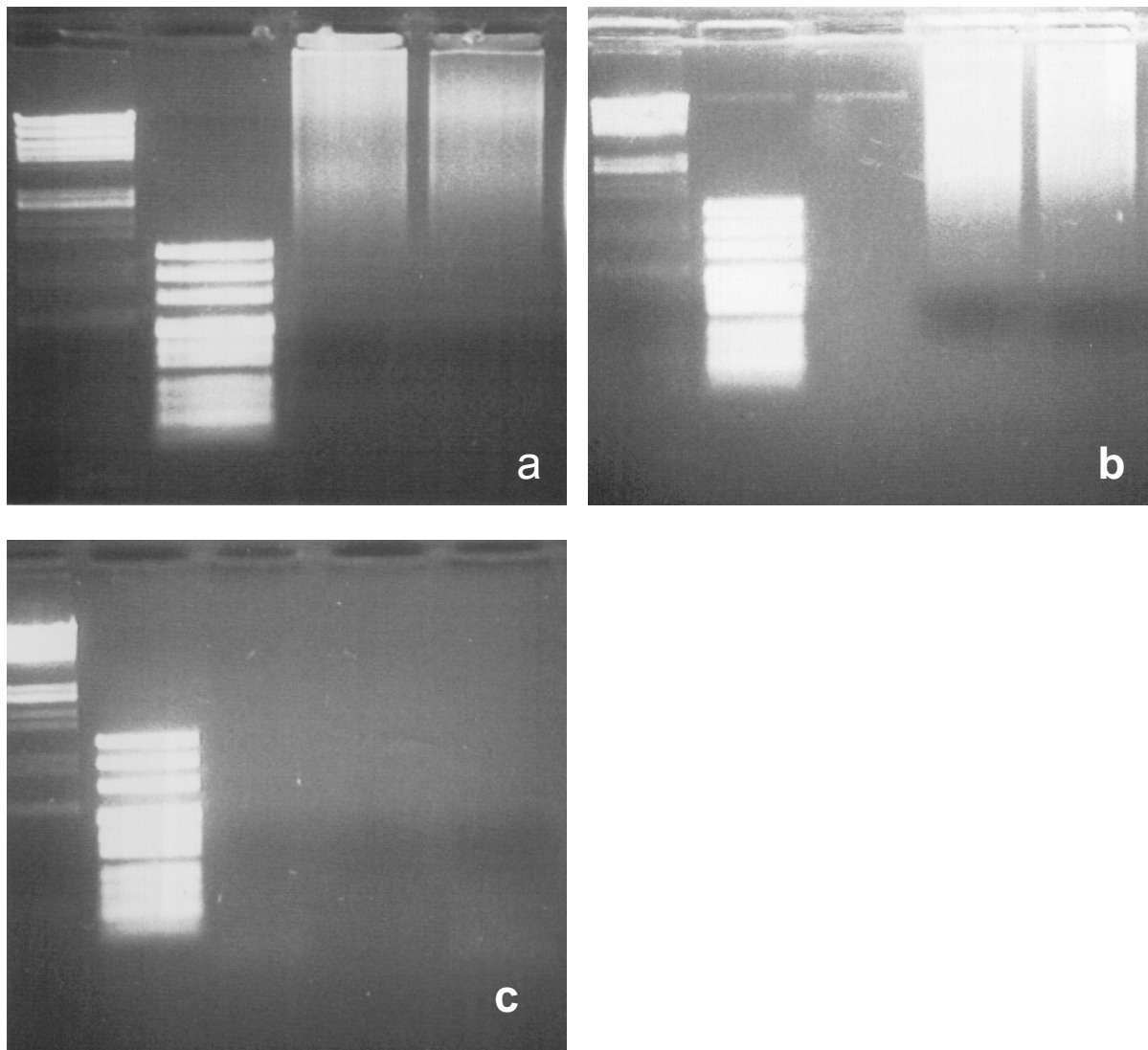


Abb. 7:

Gelelektrophorese der Gesamt-RNA aus ca. 75 Millionen Eberspermien pro Probe, die mit dem Hot-Phenol Protokoll isoliert wurde. Ausgehend von den Geltaschen nach unten ist ein Schmier sichtbar (a, b), der nur durch einen DNase I Verdau verschwindet (c).

- a** RNA-Isolat ohne weitere Behandlung
- b** RNA-Isolat nach RNaseA-Verdau
- c** RNA-Isolat nach DNase I-Verdau

4.2. Ergebnisse der Hauptversuche

4.2.1. TriZol Protokoll

Die Transkriptmengen von *PRM2* zeigten, dass das TriZol Protokoll sehr gleichmäßige Isolationsergebnisse ergab. Es wurden regelmäßig ca. 500.000 Kopien *PRM2* mRNA aus 10 Millionen zur Isolierung eingesetzten Eberspermien gewonnen (Abb. 8).

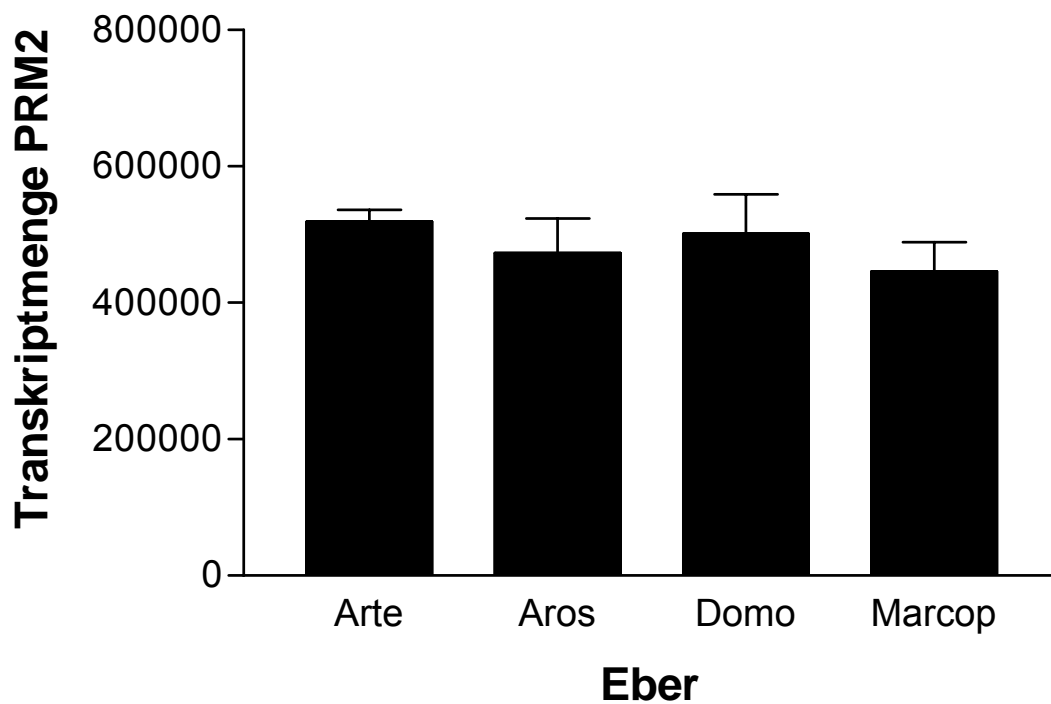
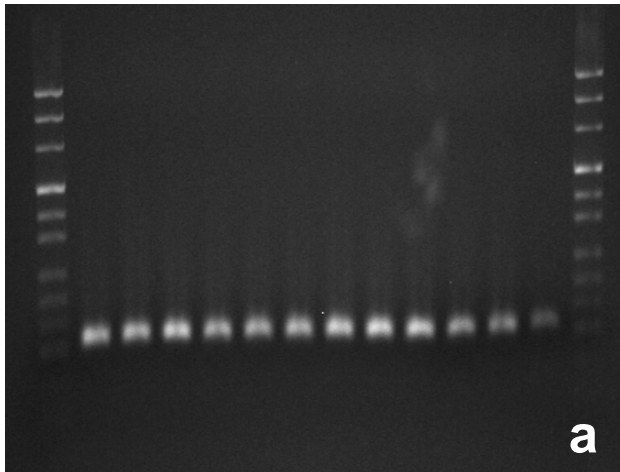


Abb. 8:

Vergleich der Transkriptmengen an *PRM2*, ermittelt durch qPCR von vier verschiedenen Eberspermienproben (pro 10 Millionen Spermien), die mit dem TriZol Protokoll isoliert wurden.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese untersucht. Die qRT-PCR Analyse der TriZol Protokoll isolierten RNA ergab nur ein cDNA-spezifisches Produkt (Abb. 9a und b).



← 118 bp



Abb. 9a:

Gelelektrophorese der qPCR-Produkte mit cDNA-spezifischem Primerpaar (TriZol Protokoll).

Abb. 9b:

Gelelektrophorese der qPCR-Produkte mit DNA-spezifischem Primerpaar (TriZol Protokoll).

4.2.2. Douglas Protokoll

Die nachweisbaren *PRM2*-Transkriptmengen von Eberspermien, aus denen die RNA mit der Douglas Methode isoliert wurde, lagen zwischen ca. 45.000 und 110.000 Kopien pro 10 Millionen zur Isolation eingesetzter Eberspermien (Abb. 10).

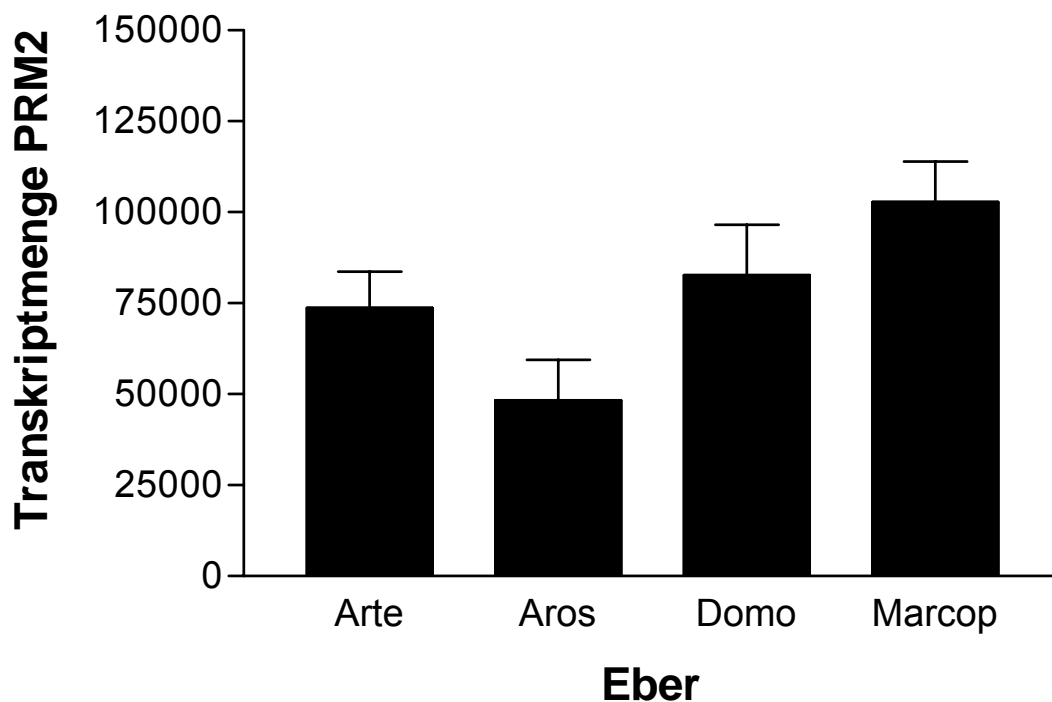
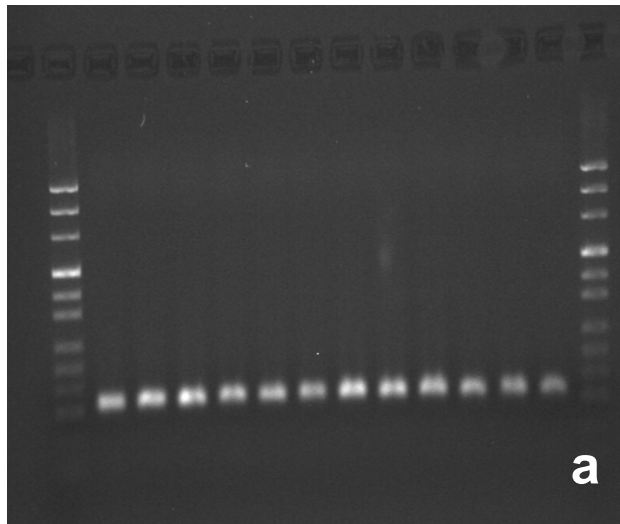


Abb. 10:

Vergleich der durch q RT-PCR ermittelten PRM2-Transkriptmengen, von vier verschiedenen Eberspermienproben, aus denen die RNA mit dem Douglas Protokoll isoliert wurde. (Kopien pro 10 Millionen Spermien)

Die Isolierung der RNA aus Eberspermien mit der Douglas Methode resultierte in Gesamt-RNA, die nicht mit DNA kontaminiert war (Abb. 11a und b).



← 118 bp

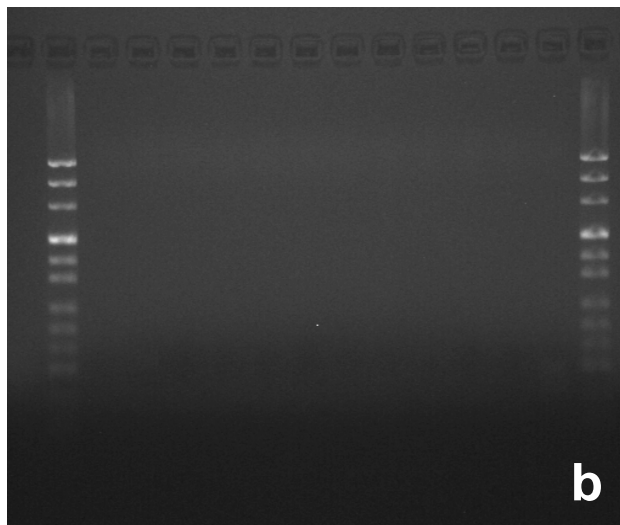


Abb. 11a:

Gelelektrophorese der qPCR Produkte mit cDNA-spezifischem Primerpaar (Douglas-Protokoll).

Abb. 11b:

Gelelektrophorese der qPCR Produkte mit DNA-spezifischem Primerpaar (Douglas-Protokoll).

4.2.3. Hot-Phenol Protokoll

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Eberspermien mit der Hot-Phenol Methode resultierte in RNA, die frei von Verunreinigung durch genomische DNA war. Es zeigte sich aber, dass bei dieser Methode im Vergleich zu den beiden vorher genannten Methoden offenbar viele Transkripte verloren gehen (Abb. 12).

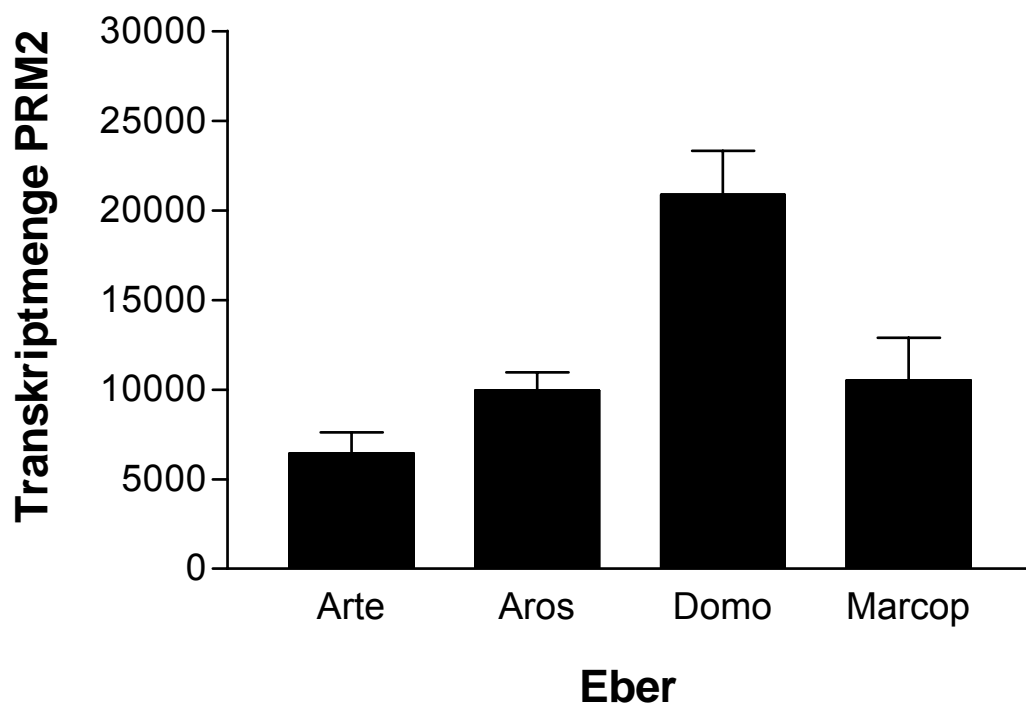
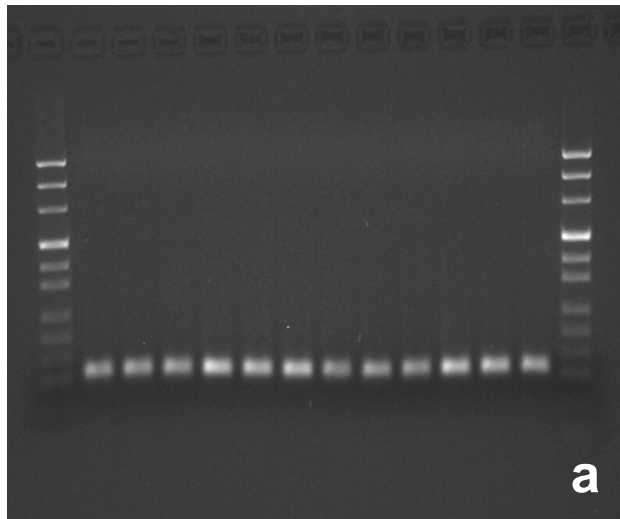


Abb. 12:

Vergleich der Transkriptmengen an PRM2, ermittelt durch qPCR von vier verschiedenen Eberspermienproben, die mit dem Hot-Phenol Protokoll isoliert wurden. (Kopien pro 10 Millionen Spermien)

Die Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigte, dass die Gesamt-RNA ohne Verunreinigung gewonnen wurde (Abb. 13a und b).



← 118 bp

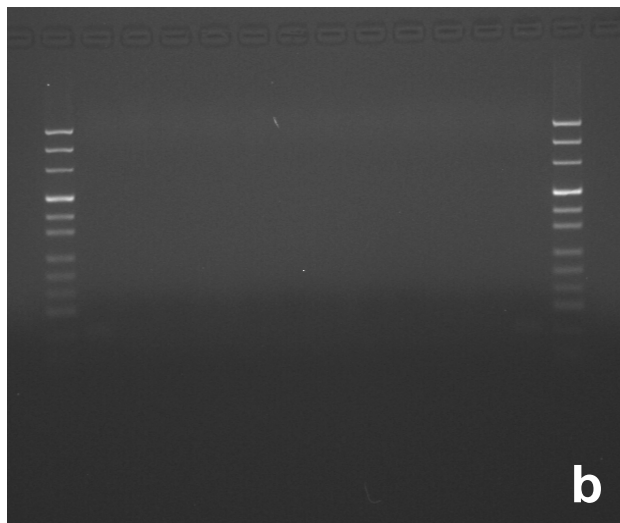


Abb. 13a:

Gelelektrophorese der qPCR
Produkte mit cDNA-spezifischem
Primerpaar (Hot-Phenol Protokoll).

Abb. 13b:

Gelelektrophorese der qPCR
Produkte mit DNA-spezifischem
Primerpaar (Hot-Phenol Protokoll).

4.2.4. Miller Protokoll

Die Gesamt-RNA, die mit dem Miller-Protokoll gewonnen wurde, zeigte starke Schwankungen zwischen den Tieren (Abb. 14).

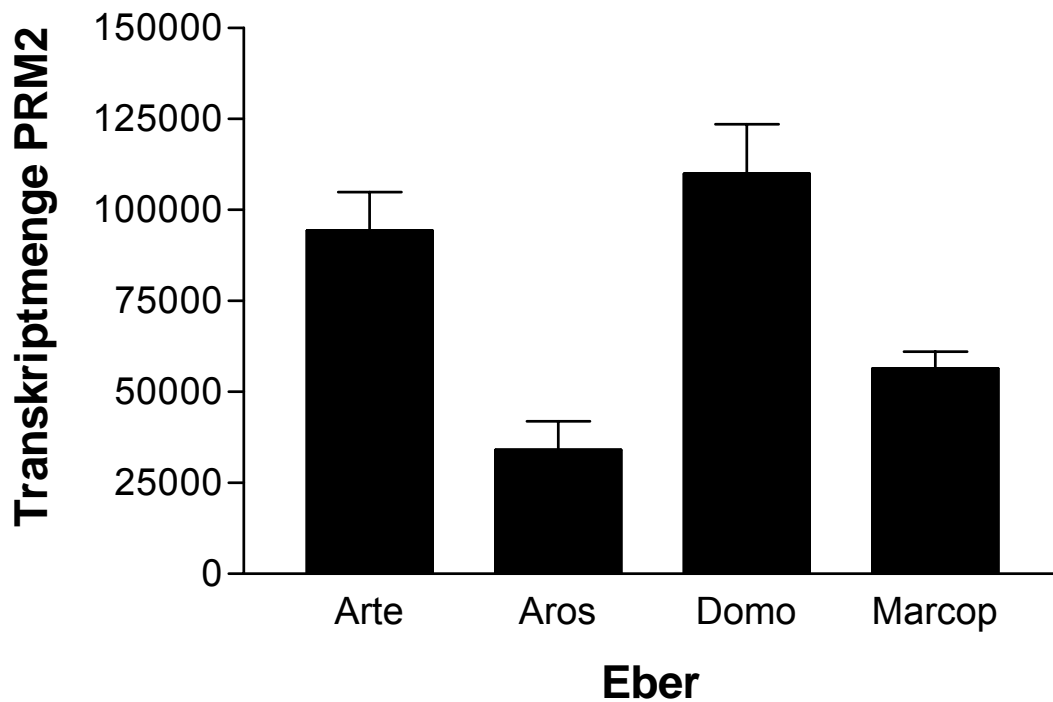
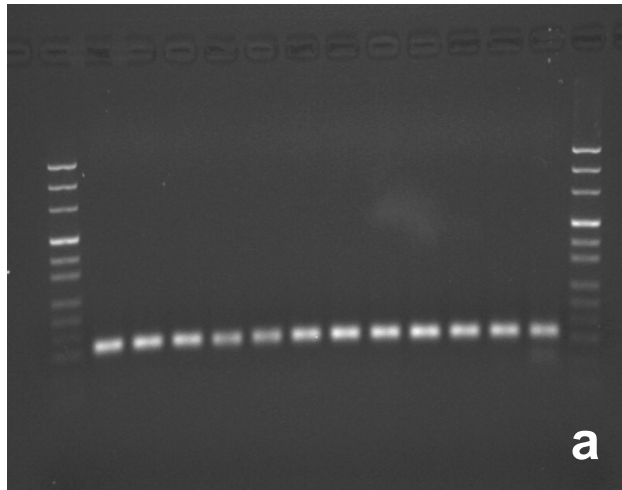


Abb. 14:

Vergleich der Transkriptmengen an PRM2, ermittelt durch qPCR von vier verschiedenen Eberspermienproben, die mit dem Miller Protokoll isoliert wurden. (Kopien pro 10 Millionen Spermien)

Mit der Miller Methode wurde Gesamt-RNA aus Eberspermien isoliert, die keine Verunreinigung mit genomischer DNA aufwies (Abb.15a und b).



← 118 bp

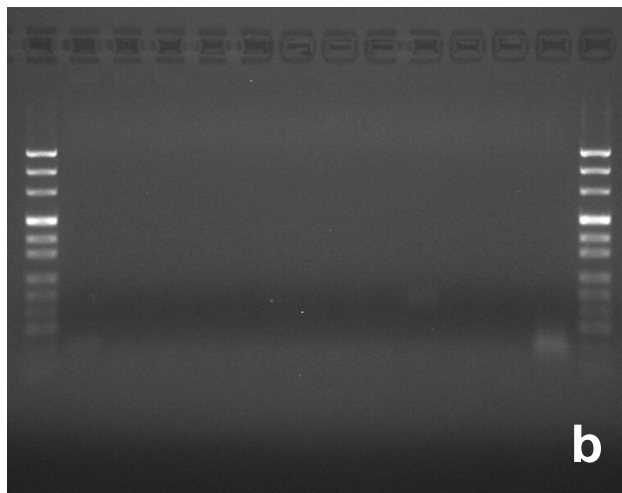


Abb. 15a:

Gelelektrophorese der qPCR
Produkte mit cDNA-spezifischem
Primerpaar (Miller Protokoll).

Abb. 15b:

Gelelektrophorese der qPCR
Produkte mit DNA-spezifischem
Primerpaar (Miller Protokoll).

4.2.5. RNA-Pure Protokoll

Die Höhe der cDNA-spezifischen PRM2 Transkripte, mittels qPCR nachgewiesen wurde, lag zwischen 400.000 und 500.000 pro 10 Millionen in die Isolierung eingesetzte Spermien (Abb. 16).

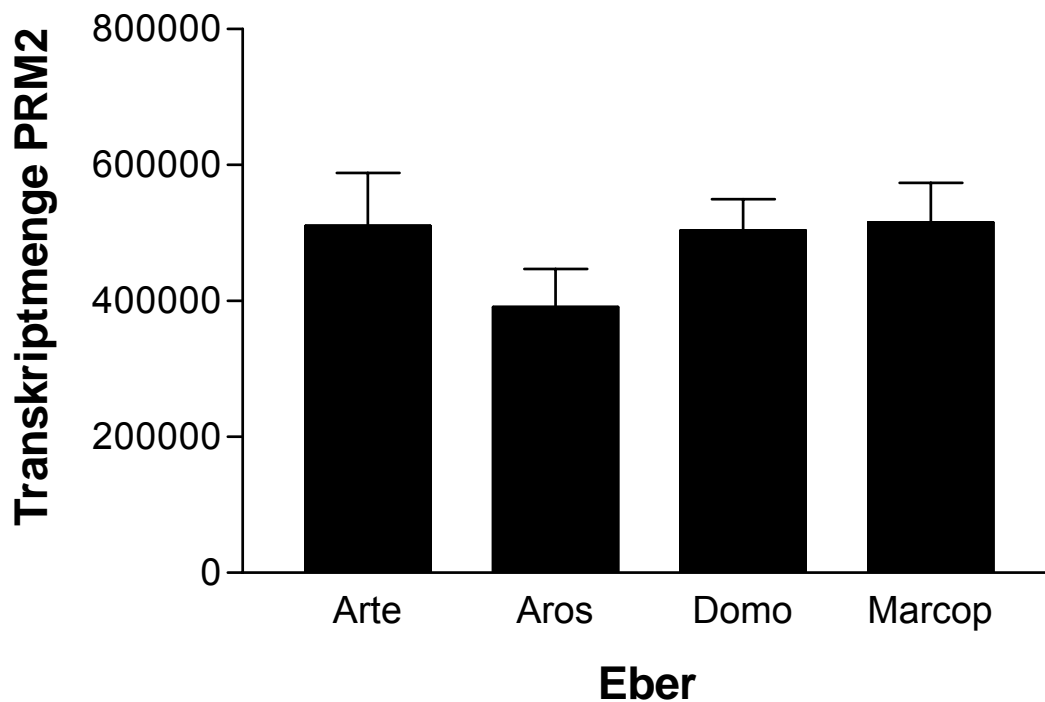


Abb. 16:

Vergleich der Transkriptmengen an PRM2, ermittelt durch qPCR von vier verschiedenen Eberspermienproben, die mit dem RNA-Pure Protokoll isoliert wurden. (Kopien pro 10 Millionen Spermien)

Wie aus den Gelbildern ersichtlich ist, sind nur cDNA-spezifische PCR-Produkte amplifiziert worden. Es wurde keine Kontamination mit genomischer DNA nachgewiesen (Abb. 17a und b).

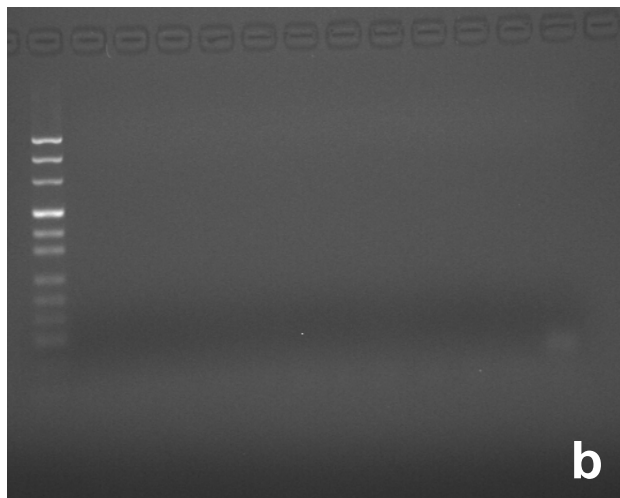
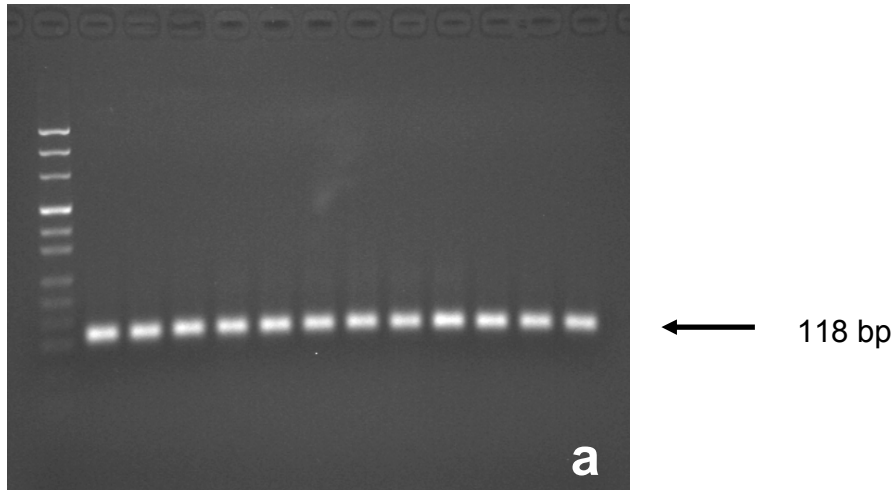


Abb. 17a:

Gelelektrophorese der qPCR
Produkte mit cDNA-spezifischem
Primerpaar (RNA-Pure Protokoll).

Abb. 17b:

Gelelektrophorese der qPCR-
Produkte mit DNA-spezifischem
Primerpaar (RNA-Pure Protokoll).

4.2.6. RNeasy Protokoll

Das RNeasy Protokoll zeigte die höchste Ausbeute an PRM2-Transkripten (Abb. 18).

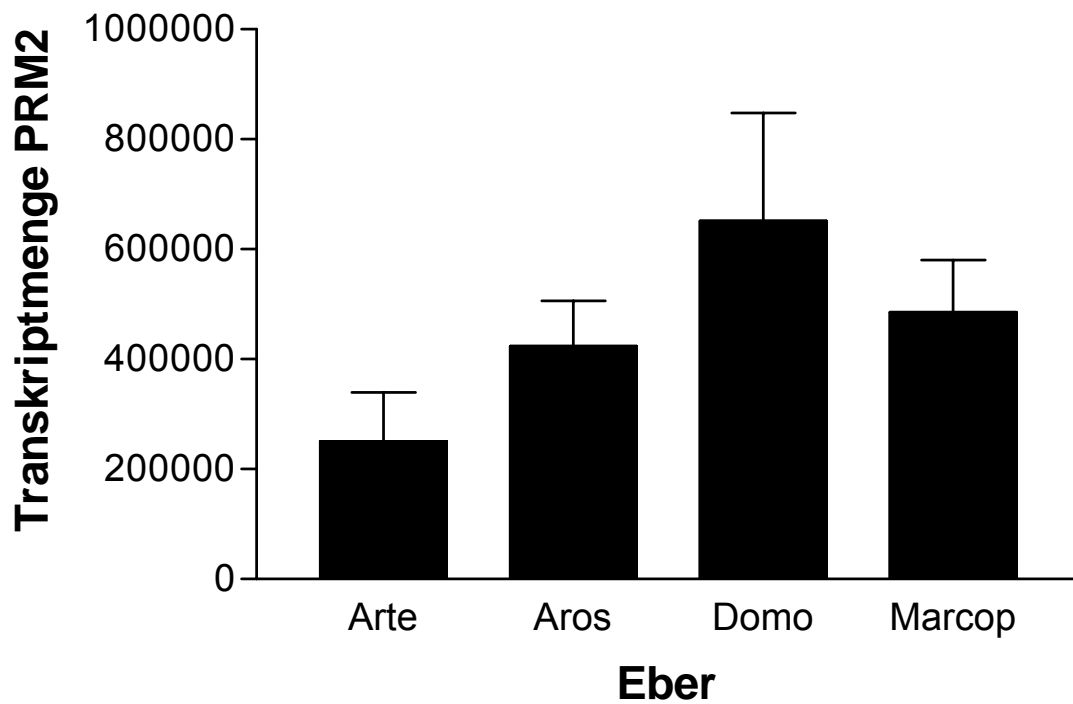


Abb. 18:

Vergleich der Transkriptmengen an PRM2, ermittelt durch qPCR von vier verschiedenen Eberspirmenproben, die mit dem RNeasy Protokoll isoliert wurden. (Kopien pro 10 Millionen Spermien)

Die Geldokumentaion der qPCR-Ergebnisse zeigte deutlich, dass sowohl cDNA- wie auch DNA-spezifische Amplifikate gebildet wurden. Dies bedeutet, dass die Proben mit genomischer DNA kontaminiert waren (Abb. 19a und b).

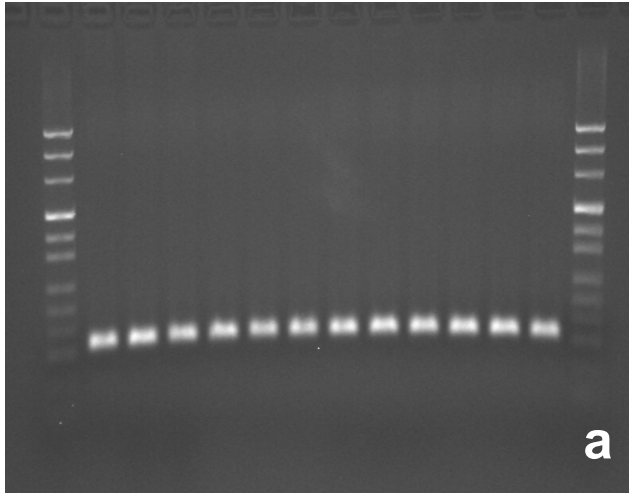


Abb. 19a:

Gelelektrophorese der qPCR Produkte mit cDNA-spezifischem Primerpaar (RNeasy Protokoll).

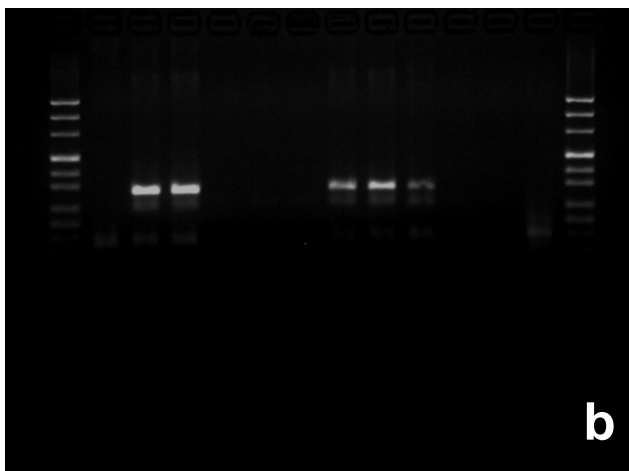


Abb. 19b:

Gelelektrophorese der qPCR Produkte mit DNA-spezifischem Primerpaar (RNeasy Protokoll).

← 305 bp

Die RNeasy Methode war die einzige von sieben untersuchten Methoden, die eine deutliche DNA-Kontamination aufwies.

4.2.7. SDS-DTT-Proteinase K Protokoll

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Eberspermien resultierte beim SDS-DTT-Proteinase K Protokoll in ca. 100.000 bis 170.000 PRM2-Transkripten pro 10 Millionen in die Isolierung eingesetzten Spermien (Abb. 20).

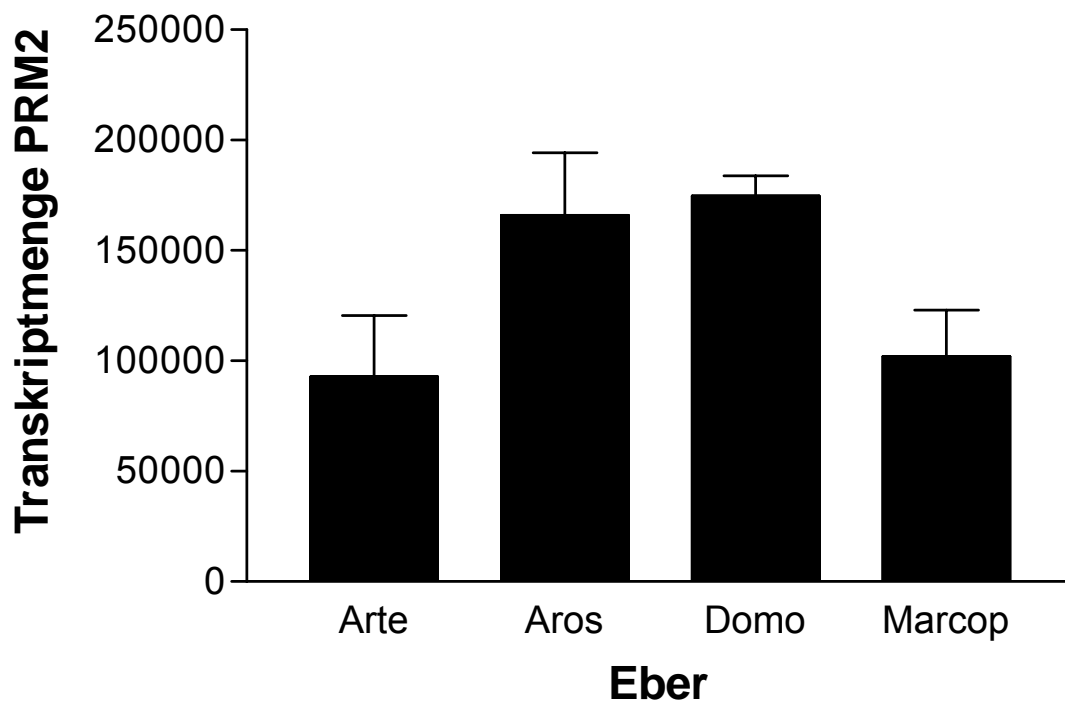
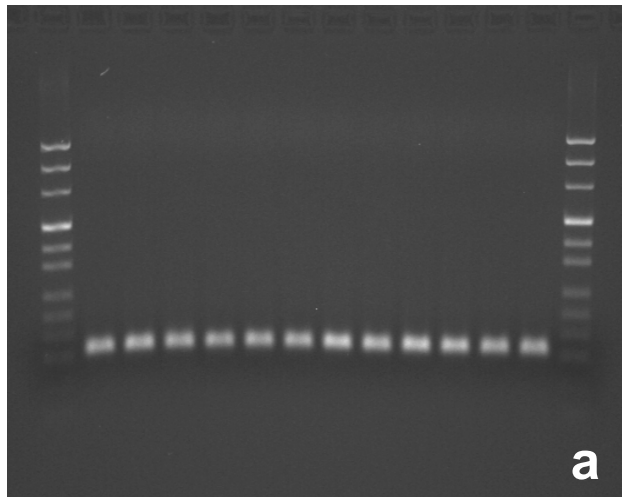


Abb. 20:

Vergleich der Transkriptmengen an PRM2, ermittelt durch qPCR von vier verschiedenen Eberspermienproben, die mit dem SDS-DTT-Proteinase K Protokoll isoliert wurden. (Kopien pro 10 Millionen Spermien)

Die Gelelektrophorese zeigte, dass die Isolate frei von genomischer Verunreinigung waren (Abb. 21a und b).



← 118 bp

Abb. 21a: Gelelektrophorese der qPCR Produkte mit cDNA-spezifischem Primerpaar (SDS/DTT/Proteinase K Protokoll).

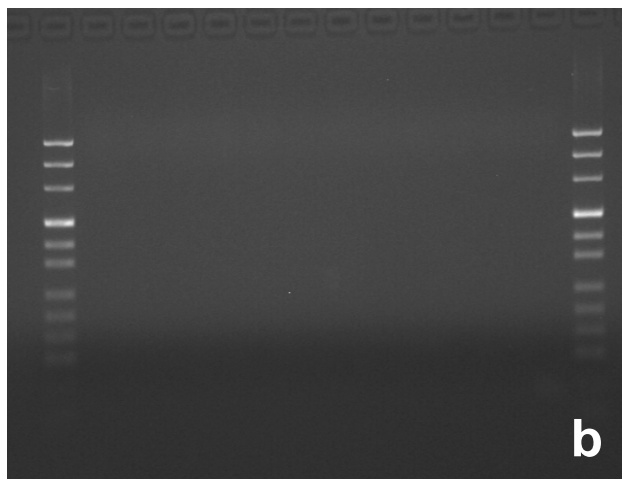


Abb. 21b: Gelelektrophorese der qPCR Produkte mit DNA-spezifischem Primerpaar (SDS/DTT/Proteinase K Protokoll).

4.2.8. Vergleich der verschiedenen Methoden

Beim Vergleich der sieben untersuchten Isolierungsprotokollen mit jeweils 10 Millionen eingesetzten Eberspermien waren die höchsten Transkriptmengen bei den TriZol, RNA-Pure und RNeasy Protokollen sichtbar (Abb. 22). Die RNeasy Isolierung resultierte aber in Kontamination mit genomischer DNA (siehe Abb. 19b).

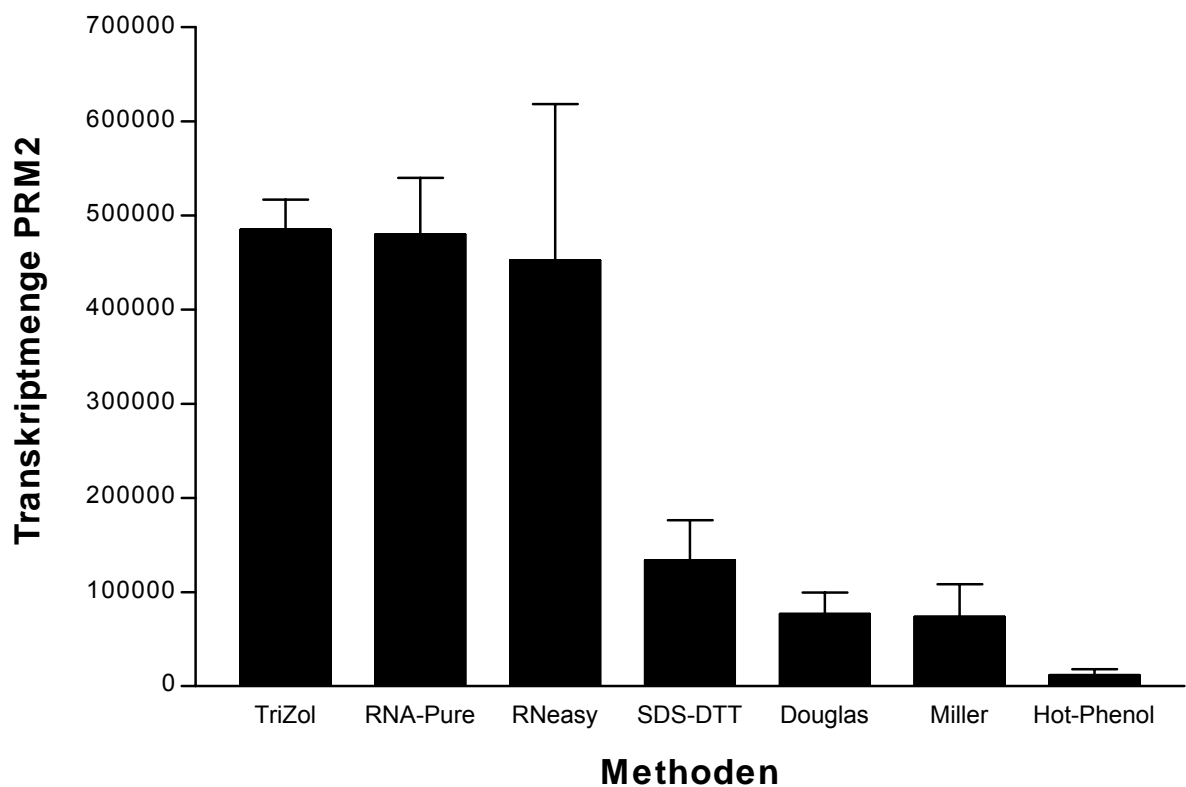


Abb. 22:

Vergleich der Transkriptmengen an PRM2, die nach den verschiedenen Isolierungsprotokollen detektierbar waren.

5. Diskussion

5.1. Isolationsmethoden

Bei der Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolierung von RNA aus Eberspermien konnte nicht auf bereits existierende Arbeiten zurückgegriffen werden. Die wenigen in der Literatur bekannten Untersuchungen zur RNA-Gewinnung aus Spermien beschrieben kaum, wie und vor allem warum die einzelnen Arbeitsschritte in den verwendeten Protokollen verändert bzw. entwickelt wurden. Auch fehlten meist eine Mengenangabe der eingesetzten Spermien, sowie Angaben über die Zeitdauer zwischen Gewinnung der ejakulierten Spermien und dem Transport bzw. der Lagerung der Spermien bis zur RNA-Gewinnung.

Ziele der Arbeit waren als erstes die Bestimmung der richtigen Spermienmenge zum verwendeten Volumen der Isolierungslösung. Es ist bekannt, dass alle Isolierungsreagenzien überladen werden können und die dann erzielten Ergebnisse nicht den gestellten Anforderungen an die Reinheit der RNA oder der RNA-Ausbeute entsprechen werden. Deshalb wurden in den Vorversuchen mit dem TriZol-Isolierungsprotokoll, das für die meisten RNA-Isolierungen verwendet wird, die Untersuchungen zur eingesetzten Spermienmenge, Waschung der Spermien und Freisetzung der RNA durch Aufbrechen der Spermienmembran durchgeführt. Das TriZol-Protokoll bietet als Vorteile z. B. eine einfache Handhabung, eine hohe RNA-Ausbeute bei somatischen Geweben und eine gute RNA-Qualität (Chomczynski und Sacchi, 1987). Nachteilig ist die Arbeit mit Phenol, weshalb diese Untersuchungen immer unter einem Abzug durchgeführt wurden, um keine Phenoldämpfe einzuatmen.

Insgesamt wurden sieben Methoden auf ihre Tauglichkeit für die Isolierung der Eberspermien-RNA untersucht. Auch sollten die unterschiedlichen Vorbehandlungen der Spermien zeigen, ob die einzelnen Protokolle oder Teilschritte kombiniert werden können, um die Effektivität der RNA-Isolierung zu erhöhen. Als Beurteilungsparameter wurden die Höhe der RNA-Ausbeute, deren Reinheit

(Abwesenheit von Kontaminationen durch genomische DNA oder Proteine) und auch das Handling des Protokolls erfasst.

Das Ausgangsmaterial wurde für alle Protokolle gleich vorbereitet. So wurde bei allen Spermienproben direkt nach der Ejakulation die Dichte bestimmt und die Spermien in Aliquots je 10 Millionen in separaten Tubes abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Hierdurch wurde ein möglicher Abbau der zu isolierenden RNA durch RNasen während der Lagerdauer vermieden. Nach dem Auftauen wurden alle Proben mit Triton X-100 behandelt, um somatische Zellen, die in jedem Ejakulat vorhanden sind, zu lysieren (Ostermeier et al., 2005a).

Spermien unterscheiden sich in mehreren Punkten von somatischen Zellen. Die Kernarchitektur ist völlig anders und auch die Zellmembran ist stabiler. Daher waren andere Anforderungen an die Vorbehandlung der Spermien gestellt, um die RNA aus diesen Zellen zu bekommen (Engelhardt und Breves, 2000; Miller et al., 2005). Bei festem Gewebe ist eine Homogenisation mit einem Stabhomogenisator möglich, dieser zerreißt den Zellverbund und die Zellmembranen, sodass die RNA aus den Zellen in die Isolierungslösung gelangen kann. Ejakulierte Spermien befinden sich nicht in einem solchen Zellverbund und der Einsatz des Homogenisators führt zu keiner nennenswerten Membranzerstörung, da die Spermien zu klein sind, um von den Scherblättern des Homogenisators erwischt zu werden. Die Vorbehandlung durch Vortexen wurde eingeführt, da bei den geringen RNA-Mengen, die erwartet wurden (Ostermeier et al., 2005a), die Gefahr einer Kontamination der Proben im Homogenisator (der für alle Proben verwendet wird) als groß eingestuft wurde. Der Homogenisator kann zwar komplett gereinigt werden, dieser Vorgang müsste aber nach jeder Probe stattfinden und der Aufwand für das Zerlegen des Scherwerkes ist dafür zu groß. Die Behandlung durch Vortexen fand dagegen in einzelnen Tubes, die auch für die weiteren Isolierungsschritte verwendet wurden, statt. Somit wurden die Kontaminationsmöglichkeiten und die RNA-Verluste eingegrenzt. Außerdem stellt eine Zerstörung der äußeren Spermienhülle nur ein Teilschritt dar, da auch die RNAs, die als freie mRNAs oder als RNPs vorliegen, sich noch in den Chromatinkörperchen befinden (Steger, 1999). Ferner haben die RNAs in der

Spermienarchitektur eine unterstützende Funktion, d.h. eine zu starke Vorbehandlung der Spermien erhöht vielleicht die RNA-Ausbeute, gleichzeitig wird aber auch die DNA vollständig mit frei gesetzt (Miller et al., 2005). Ob sich die DNA aus Spermien bei der Isolierung anders als DNA aus somatischen Zellen verhält, ist nicht bekannt. Auffällig ist allerdings das schnelle Überladen des Systems mit DNA-Kontaminationen. Dies liegt wahrscheinlich an dem Verhältnis zwischen RNA und DNA, das bei Spermien anders als bei somatischen Zellen ist. Die Gesamt-RNA pro somatische Zelle beträgt durchschnittlich ca. 10-30 pg und pro Spermium nur ca. 0,015 pg (Miller et al., 2005). Da das DNA-Gewicht beim haploiden Chromosomensatz ca. 6,8 pg und beim haploiden Satz 3,4 pg beträgt, ist in Spermien der DNA-Anteil verhältnismäßig hoch (Quelle Fa. Qiagen). Dies kann weiter bedeuten, dass zur Erzielung großer RNA-Ausbeuten verhältnismäßig viel DNA mitisoliert wird und das TriZol-Reagenz (wie auch die anderen Isolierungsreagenzien) schnell überladen wird, da sich die DNA nicht nur in der Interphase, sondern auch in der wässrigen Phase befindet. Diese Verringerung der Gesamt-RNA Menge in Spermien muss zwangsläufig nicht bedeuten, dass auch nur ca. 1/100 der mRNA-Menge pro Spermium (im Vergleich zur somatischen Zelle) enthalten sein muss. Da sich der Anteil der in somatischen Zellen hoch vorkommenden ribosomalen RNA deutlich verringert hat (Ostermeier et al., 2002), ist davon auszugehen, dass der mRNA-Anteil pro Spermium sogar höher sein kann als in somatischen Zellen.

Am einfachsten waren die klassischen Protokollen, wie TriZol und RNA-Pure, zu adaptieren, da schon die RNA-Isolierung ohne eine besondere Vorbehandlung der Spermien zur Gewinnung von Gesamt-RNA führte. Die RNA, die aus 10 Millionen Spermien isoliert wurde, konnte auf Grund zu geringer Isolat-Menge nicht mit dem Agarosegel beurteilt werden. Nur durch quantitative Real-Time PCR war die Existenz der *PRM2* Transkripte nachzuweisen.

Das Schockgefrieren der Spermien ohne kryoprotektive Stoffe im Medium und die Vorbehandlung der Spermien vor der eigentlichen Isolierung mit Triton X-100 und das anschließende Vortexen reichten aus, um eine gute RNA-Ausbeute zu erzielen.

Die Protokolle von Miller, Douglas und die SDS-DTT-Proteinase K Vorbehandlungen sollten weitere Möglichkeiten der Spermiovorbehandlung zeigen (Miller et al., 1994; Krebs und Favor, 1997). Daneben ist der Vergleich der einzelnen Protokolle wichtig, ob sich z.B. der erhöhte Zeit- und Arbeitsaufwand in einer höheren und besseren RNA-Ausbeute niederschlägt. Dies war bei den drei genannten Protokollen nicht zu beobachten. Es wurde bei keinem der Protokolle eine höhere RNA-Ausbeute erzielt.

Das nur für Hefen etablierte Hot-Phenol Protokoll zeigte auch keinen Vorteil gegenüber den modifizierten TriZol oder RNA-Pure Protokollen. Zudem ist bei diesem Protokoll die Arbeit mit heißem Phenol gefährlich, da das bei Raumtemperatur schon toxische Phenol hierbei auf 65°C erhitzt werden musste (Kohrer und Domdey, 1991). Arbeiten mit Phenol finden immer unter einem Laborabzug statt, um keine Phenoldämpfe einzuatmen, jedoch ist auch das Handling mit heißen Proben eine weitere Gefahrenquelle im Labor, die nach Möglichkeit vermieden werden sollte. Die RNA-Isolierung mit der Hot-Phenol Methode erbrachte keine Vorteile gegenüber den beiden klassischen Verfahren, so dass auf diese Gefahrenquelle im Labor verzichtet werden kann.

Einig sind sich alle Autoren, die RNA aus Spermien gewonnen haben, dass Spermien besondere Anforderungen an die RNA-Isolierung stellen. Dennoch findet sich keine Publikation, die eine Optimierung der einzelnen Isolationsschritte beschreibt.

Die beschriebenen Methoden zur RNA-Isolierung beziehen sich fast immer auf Humanspermien (Miller et al., 1994; Ostermeier et al., 2005; Wang et al., 2004; Lambard et al., 2004). Es ist jedoch fraglich, ob sich Eberspermien genauso bei der RNA-Isolierung verhalten wie Humanspermien. Aus der tierzüchterischen Praxis ist bekannt, dass Eberspermien sehr sensibel auf Umweltänderungen reagieren, vielleicht ist dies eine mögliche Ursache für die geringe RNA-Ausbeute bei den zeitintensiven Spermiovorbehandlungen in den Isolierungsprotokollen von Miller, Douglas oder Ostermeier.

Die zusätzlichen Arbeitsschritte beinhalten auch immer die Gefahr, dass dabei RNA abgebaut werden kann. Außerdem ist es bekannt, dass freie RNA (auch DNA) sich an die Wände der Reaktionsgefäße binden kann und nicht mehr in Lösung geht. Vielleicht ist die geringe RNA-Ausbeute auf diese Effekte zurückzuführen.

5.1.1. Weitergehende RNA-Untersuchungen

Die Beurteilung des RNA-Pellets ist ein erster makroskopischer Eindruck der gewonnenen Gesamt-RNA (bei der RNeasy-Methode ist kein Pellet sichtbar, da die RNA von einer Membran eluiert wird). Dies ist aber für eine Beurteilung zuwenig. Weitergehend ist die Untersuchung und Beurteilung der Gesamt-RNA auf Agarosegelen, die RNase-frei hergestellt werden müssen. Bei dieser Gelanalyse ist es möglich, eine Aussage über die Qualität und mögliche Kontaminationen zu treffen. Die RNA-Qualität kann normalerweise an dem Verhältnis der beiden rRNA-Banden (18S und 28S) beurteilt werden. Bei Gesamt-RNA aus Spermien ist diese Beurteilung nicht möglich, da der ribosomale RNA-Anteil in diesem Zelltypus wesentlich geringer ist als in somatischen Zellen, sodass keine ribosomalen Banden auf dem Agarosegel sichtbar sind (Ostermeier et al., 2002). Dagegen ist ein Schmier sichtbar, der nach einer RNase-Behandlung nicht mehr existiert und nach einer DNase-Behandlung unverändert bleibt. Dieser Schmier setzt sich aus einer Vielzahl von RNAs unterschiedlicher Länge zusammen, sodass nicht ein Bandenverteilungsmuster, sondern eben nur ein Schmier zu sehen ist. Auffällig hierbei ist, dass im Bereich unterhalb von 200 Basenpaaren bei allen Isolierungsverfahren eine Ansammlung an RNAs zu sehen ist. Vielleicht beinhaltet diese RNA vor allem die kurzen RNAs (z. B. siRNA, miRNA; Storz, 2002; Ostermeier et al., 2004; Miller et al., 2005). Die Kontamination mit DNA ist ebenfalls auf dem Gel sichtbar, da sich genomische DNA sehr langsam im elektrischen Feld bewegt und daher meist in den Geltaschen verbleibt oder sich nur minimal darunter befindet. Bei den RNA-Isolationen aus Spermien entsteht bei hoher DNA-Kontamination ein „DNA-Schmier“, der von den Geltaschen ausgeht und nach unten zieht. Der Schmier besteht wahrscheinlich aus gescherter DNA und zeigt so DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge. Bei Vorliegen eines solchen Ergebnisses zeigte der Verdau

der Proben mit DNase I und nachfolgender Gelelektrophorese, dass kein Schmier mehr sichtbar war. Dagegen zeigte ein Verdau mit RNaseA keine Veränderung. Des Weiteren sind Kontaminationen mit Proteinen oder Lipide sichtbar, die sich vor allem in einem nicht gleichmäßigen Lauf der Proben zeigt (Abb. 5b).

Die Beurteilung der isolierten RNA-Proben mittels der Gelelektrophorese ließ somit Aussagen zur RNA-Reinheit zu. Eine sichere Aussage über die RNA-Ausbeute ist allerdings nicht möglich. Hierfür eignen sich Verfahren, die die RNA-Menge messen können, wie die photometrische Dichtebestimmung der RNA oder die quantitative Real-Time PCR, bei der die Transkripthöhe eines ausgewählten Gens durch absolute Quantifizierung bestimmt wird (Higuchi et al., 1992). Außerdem kann ebenfalls eine Kontamination mit DNA, die auf dem Gel noch nicht sichtbar ist, ermittelt werden. Es wurde das Gen *PRM2* gewählt, weil dessen Transkripte nur im Hoden und in Spermien vorkommen (Miller, 1997; Wykes et al., 1997). Dies bedeutet, dass eine Verunreinigung mit somatischen Zellen keinen Einfluss auf die *PRM2*-Transkripthöhe hat. Des Weiteren war *PRM2* eines der wenigen porcinen Gene, bei dem nicht nur die Exongrenzen, sondern auch die Intronsequenzen bekannt waren. Transkripte des *PRM2* Gens treten vor allem in den elongierten Spermatiden auf, und werden für die Kompaktierung der Spermien-DNA gebraucht (Miller et al., 2000; Steger 2001; Wang et al., 2004; Wykes et al., 1997). Allerdings wurden in den Publikationen keine Angaben zur *PRM2* Transkriptmenge (pro Spermium) gemacht. In der Arbeit von Ostermeier et al. (2005b), in der die behandlungsresistenten RNAs isoliert und nachgewiesen wurden, sind die *PRM2* Transkripte nicht aufgeführt. Möglicherweise werden diese RNAs schneller während der Isolierung zerstört. Dies wäre eine Erklärung, warum bei allen untersuchten Isolationsmethoden nicht mindestens ein *PRM2*-Transkript pro Spermium gefunden wurde. Die geringe Ausbeute resultiert vielleicht auch daher, dass der erste zusätzliche Zentrifugationsschritt (Entfernung der Zelltrümmer) mit RNA-Verlusten einherging. Dieser Schritt war aber nötig, da ansonsten keine verwertbare RNA gewonnen wurde.

Nach dem die RNA in die strukturelle Organisation des Spermienkerns involviert ist (Miller et al., 2005), zieht vermutlich eine solche massive Zerstörung des

Spermengerüsts auch eine Zerstörung der RNA mit sich. Dies kann vielleicht eine Erklärung für die geringe RNA-Ausbeute des Hot-Phenol Protokolls sein, da möglicherweise die Spermien durch die Behandlung mit heißem Phenol zu stark behandelt wurden.

5.1.2. Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR

Beim Vergleich der Transkripthöhen des *PRM2* Gens bei allen Methoden zeigte sich, dass mit dem Miller-Protokoll nur ca. 1/5 der Transkripte, die mit dem TriZol- oder RNA-Pure-Protokoll gewonnen werden konnten, erreicht wurde. Die Hot-Phenol Methode erzielte nur ca. 1/30 der mit den beiden anderen Protokollen erzielten Transkriptmengen.

Die beiden angewendeten Protokolle Douglas (Krebs und Favor, 1997) und SDS/DTT/Proteinase K sind mit einer langen Vorbehandlungszeit der Spermienproben verbunden und zeigten nur mittlere Ergebnisse hinsichtlich der RNA-Ausbeute. Die Verlängerung des Isolierungsprotokolls gegenüber den TriZol- oder RNA-Pure- Protokollen betrug bei Douglas ca. 3,5 Stunden und im SDS/DTT/Proteinase K Protokoll noch 2 Stunden. Die längere Vorbehandlung der Spermien, die in einer besseren Verfügbarkeit der RNA und damit in einer höheren RNA-Ausbeute resultieren sollte, war nicht gegeben und rechtfertigt nicht den hohen zeitlichen Aufwand. Im Vergleich zum TriZol-Protokoll war die RNA-Ausbeute mit dem Douglas-Protokoll nur ein 1/8 und nach der SDS/DTT/Proteinase K Vorbehandlung nur 1/3, gemessen an der *PRM2* Transkriptmenge aus den TriZol Versuchen.

Die von Ostermeier et al. (2005a) durchgeführte RNA-Isolierung aus Humanspermien zeigte bei der Übertragung auf die RNA-Isolierung aus Eberspermien zwar eine hohe RNA-Ausbeute, aber gleichzeitig auch eine hohe Kontamination mit genomischer DNA. Da die erzielte *PRM2* Transkriptmenge der RNeasy-Methode vergleichbar mit den Ergebnissen der TriZol- und RNA-Pure-

Protokolle ausfiel, wurde aufgrund der DNA-Kontamination diese Methode als nicht tauglich zur RNA-Isolierung aus Eberspermien beurteilt.

Die Untersuchung der vier ausgewählten Eber zeigte, dass der Eber Domo bei (fast) allen Isolierungen die höchste Transkriptmenge auswies. Dies kann auf eine bessere Verfügbarkeit der RNA bei den einzelnen Ebern deuten oder vielleicht auf eberspezifische Unterschiede in der Gesamt-RNA Menge.

Weitere Untersuchungen mit der hier etablierten Isolierungsmethode für die RNA-Gewinnung aus Eberspermien können diese Fragestellung untersuchen. Vielleicht ist auch eine Aussage über die Gesamt-RNA oder über Transkriptmengen ausgewählter Gene entscheidend für die unterschiedlichen Befruchtungsraten zwischen Ebern, die nach der morphologischen Beurteilung der ejakulierten Spermien keinen Unterschied erkennen lassen.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine optimale Isolationsmethode für Gesamt-RNA aus Eberspermien zu etablieren. An diese Methode wurden folgende Anforderungen gestellt: eine größtmögliche RNA-Ausbeute, gute Qualität der RNA und keine Kontamination durch genomische DNA. Diese Parameter wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese und der quantitativen Real-Time PCR mit cDNA- und DNA-spezifischen Primern untersucht und beurteilt.

Aus der Literatur wurden sieben unterschiedliche Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA entnommen und für die Isolierung der RNA aus Eberspermien angepasst. Dabei wurden zwei Methoden (Miller und RNeasy) ohne Veränderungen des beschriebenen Protokolls angewendet. Die anderen fünf Methoden wurden entweder in Teilschritten modifiziert (TriZol, RNA-Pure und SDS/DTT/Proteinase K) oder an die RNA-Isolation aus Eberspermien angepasst (Douglas, Hot-Phenol).

Das am besten geeignete Isolierungsverfahren musste in der Gelelektrophorese eine gute RNA-Qualität und keine nachweisbare Kontaminationen mit genomischer DNA zeigen. Mittels DNA-spezifischen Primern wurde in der quantitativen Real-Time PCR nachgewiesen, dass keine Kontaminationen mit genomischer DNA in den isolierten Proben vorlagen. Die RNA-Ausbeute wurde mit einem cDNA-spezifischen Primer ebenfalls in der quantitativen Real-Time PCR beurteilt, indem die Transkriptmengen des Protamin 2 Gens (*PRM2*) in absoluten Kopienzahlen bestimmt wurden.

Das TriZol- und das RNA-Pure-Protokoll erfüllten beide die Anforderungen an die RNA-Ausbeute und -Qualität. Nur die RNeasy-Methode resultierte in Kontaminationen mit genomischer DNA. Die anderen vier Protokolle ermöglichten eine Isolierung von sauberer RNA, jedoch waren die RNA-Ausbeuten deutlich geringer als beim TriZol- oder RNA-Pure-Protokoll.

Interessanterweise wurden in den Isolaten von ca. 10 Millionen Spermien weniger als 1 Million Kopien des *PRM2* Gens gefunden. Die Ursachen hierfür können zum einen

Verluste von RNA in den einzelnen Vorbehandlungsschritten der Spermien sein oder zum anderen ein Abbau der *PRM2* Transkripte schon während der Spermatogenese.

7. Summary

Experiments to establish a protocol for the isolation of RNA from boar spermatozoa

The aim of this work was to establish an optimal method for RNA isolation from the boar spermatozoa. This method should meet the following requirements: maximum amount of extracted RNA with high level of purity and avoidance of contamination by genomic DNA. These parameters were examined and judged by gel electrophoresis and quantitative real time PCR with cDNA- and DNA-specific primers.

Seven different methods for the isolation of total RNA were selected from the literature. These methods were adopted for isolation of RNA from the boar sperms. Two of the chosen methods (Miller and RNeasy) were used without modifications, according to the description given in the protocols. The other five methods were partially modified (TriZol, RNA-Pure and SDS/DTT/Proteinase K) or adapted for RNA isolation from boar sperms (Douglas, Hot-Phenol).

The most suitable isolation procedure has to show a good quality of RNA as evaluated by gel electrophoresis and no detectable contamination with genomic DNA. By quantitative real time PCR with DNA-specific primers it was proved that the isolated RNA samples were not contaminated with genomic DNA. Extracted RNA was also tested by quantitative real time PCR with cDNA specific primers in order to determine the exact amount of transcripts of the protamine 2 gene (*PRM2*).

The TriZol and RNA-pure protocols both fulfil the requirements regarding quality and amount of isolated RNA. In contrast, the RNeasy method isolated RNA with genomic DNA contamination. The other four protocols allow isolation of “clean” RNA as well, but the quantity of RNA which could be recovered by these methods was less as compared to the TriZol and RNA-pure extraction procedures.

Interestingly, in RNA samples isolated from about 10 millions sperms less than 1 million copies of *PRM2* transcript were found. Possible reasons for this finding include loss of RNA during sperm processing and RNA extraction or degradation of *PRM2* transcripts already during the spermatogenesis.

8. Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., 1997. Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Balhorn R., Gledhill B.L., Wyrobek A.J., 1997. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochem.* **16**, 4074-4080

Bongso T.A., Ng S.C., Mok H., Lim M.N., Teo H.L., Wong P.C., Ratnam S.S., 1989. Effect of sperm motility on human in vitro fertilization. *Arch Androl.* **22**, 185-190

Braun R. E., Behringer R.R., Peschon J., Brinster R.L., Palmiter R. D., 1989. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature.* **337**, 373- 376

Cataldo L., Mastrangelo M.-A., Kleene K.C, 1999. A quantitative sucrose gradient analysis of the translational activity of 18 mRNA species in testes from adult mice. *Mol Hum Reprod.* **5**, 206-213

Cho C., Jung-Ha H., Willis W.D., Goulding E.H., Stein P., Xu Z., Schulz R.M., Hecht N.B., Eddy E.M., 2003. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Bio Reprod.* **69**, 211-217

Coetzee K., Kruger T.F., Lombard C.J., 1998. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod. Update* **4**, 73-82

Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156-159

Diez-Sanchez C., Ruiz-Pesini E., Montoya J., Perez-Martos A., Enriquez J. A., Lopez-Perez M. J., 2003. Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. *FEBS.* **27662**, 205-208

Edwards R.G., Beard H.K., 1999. Hypothesis: sex determination and germline formation are committed at the pronucleate stage in mammalian embryos. *Mol Hum Reprod.* **5**, 595-606

Engelhardt W.v., Breves G., 2000. Reproduktion bei Säugetieren. In: Physiologie der Haustiere. *Enke im Hippokrates Verlag GmbH*, Stuttgart, 514-552

Gardiner-Garden M., Ballesteros M., Gordon M., Tam P., 1998. Histone- and protamine- DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol.* **18(6)**, 3350-3356

Garner D.L. und Hafez E.S.E., 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Reproduction in Farm Animals. Philadelphia, 96-109

Gilbert S.F., 2003. Developmental Biology, 7 th Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland

Guo G.-Q., Zheng G.-C., 2004. Hypotheses for the functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms. *J of Theoretical Biol.* **229**, 139-146

Hendriksen P. J. M., Hoogerbrugge J. W., Themmen A. P. N., Koken M. H. M., Hoeijmakers J. H. J., Oostra B. A., Tette Van Der Lende, and Grootegeed J. A., 1995. Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol.* **170**, 730-733

Hees H. und Sinowatz F., 1992. Männliche Geschlechtsorgane. In: Histologie, Deutsche Ärzte Verlag, 284-298

Hirano Y., Shibahara H., Obara H., Suzuki T., Takamizawa S., Yamaguchi C., 2001. relationship between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilisation rates in vitro. *J Assist Reprod Genet.* **18**, 213-218

Kitamura K., Tanaka H., and Nishimune Y., 2003. Haprin, a novel haploid germ cell-specific RING finger protein involved in the acrosome reaction. *J Bio Chem.* **278(45)**, 44417-44423

Kohrer K, Domdey H., 1991. Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.* **194**, 398-405

Kono T., Obata Y., Wu Q., Niwa K., Ono Y., Yamamoto Y., Park E.S., Seo J.-S., Ogawa H., 2004. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature* **428**, 860-864

Krebs O., Favor J., 1997. Somatic and germ cell mutagenesis in lambda *lacZ* transgenic mice treated with acrylamide or ethylnitrosourea. *Mutat Res.* **388**, 239-248

Lambard S., Galeraud-Denis I., Martin G., Levy R., Chocat A., Carreau S., 2004. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod.* **10**, 535-541

Martins R.P., Krawetz S.A., 2005. RNA in human sperm. *Asian J Androl.* **7(2)**; 115-120

Miller D., 1997. RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *Mol Hum Reprod.* **3 (8)**, 669-676

Miller D., 2000. Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* **56**, 259-264

Miller D., Briggs D., Snowden H., Hamlington J., Rollinson S., Lilford R., Krawetz S. A., 1999. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene.* **237**, 385-392

Miller D., Ostermeier G.C., Krawetz S.A., 2005. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med.* **11(4)**; 156-163

Miller D., Tang P.Z., Skinner C., Lilford R.J., 1994. Differential RNA fingerprinting as a tool in the analysis of spermatozoal gene expression. *Hum Reprod.* **9**, 864-869

Monesi V., 1965. Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis in the mouse testis. *J Cell Biol.* **22**, 521-532

Morales C.R., Lefrancois S., Chennathukuzhi V., El-Alfy M., Wu X., Yang J., Gerton G.L. and Hecht N.B., 2002. A TB-RBP and Ter ATPase complex accompanies specific mRNAs from nuclei through the nuclear pores and into intercellular bridges in mouse male germ cells. *Develop Biol.* **246**, 480-494

Moss S.B., VanScoy H. and Gerton G.L. 1997. Mapping of a haploid transcribed and translated sperm-specific gene to the mouse X chromosome. *Mamm Genome.* **8**, 37-38

Ostermeier G. C., Dix D. J., Miller D., Khatri P., Krawetz S. A., 2002. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* . **360**, 772-777

Ostermeier G.C., Miller D., Huntriss J.D., Diamond M.P., Krawetz S.A., 2004. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* **13**, 429 (6988):154

Ostermeier G.C., Goodrich R.J., Moldenhauer J.S., Diamond M.P., Krawetz S.A., 2005a. A Suite of Novel Human Spermatozoal RNAs. *J Androl.* **26**, 70-74

Ostermeier G.C., Goodrich R.J., Moldenhauer J.S., Diamond M.P., Dix D.J., Krawetz S.A., 2005b. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertil Steril.* **83**, 1687-1694

Perez-Pe R., Marti J.I., Sevilla E., Fernandez-Sanchez M., Fantova E., Altarriba J., Cebrian-Perez J.A., Muino-Blanco T., 2002. Prediction of fertility by centrifugal countercurrent distribution (CCCD) analysis: correlation between viability and heterogeneity of ram semen and field fertility. *Reproduction* **123**, 869-875

Pittoggi C., Renzi L., Zaccagnini G., Gimini D., Degrassi F., Giordano R., Magnano A.R., Lorenzini R., Lavia P., Spadafora C., 1999. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci.* **112(Pt.20)**, 3537-3548

Plasterk R.H.A., 2002. RNA silencing: The genome's immune system. *Sci.* **296**, 1263-1265

Rüsse I. und Sinowatz F., 1998. Gametogenese. In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey Buchverlag Berlin. 2 Auflage, 42-88

Schmidt E.E., Hanson E. S. und Capecchi M. R., 1999. Sequence-Independent assembly of spermatid mRNAs into messenger ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol.* **19(5)**, 3904-3915

Soon L.L.L., Ausio J., Breed W.G., Power J.H.T., Muller S., 1997. Isolation of histones and related chromatin structures from spermatozoa nuclei of a dasyurid marsupial, *Sminthopsis crassicaudata*. *J Exper Zool.* **278**, 322-332

Steger K., 1999. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol.* **199**, 471-487

Steger K., 2001. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol.* **203**, 323-334

Storz G., 2002. An expanding universe of noncoding RNAs. *Sci.* **296**, 1260-1263

Travis A.J., Foster J.A., Rosenbaum N.A., Visconti P.E., Gerton G.L., Kopf G.S., Moss S.B., 1998. Targeting of germ cell-specific type1 hexokinase lacking a porin domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 263-276

Ventela S., Toppari J., Parvinen M., 2003. Interzellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2768-2780

Wang H., Zhou Z., Xu M., Li J., Xiao J., Xu Z., Sha J., 2004. A spermatogenesis-related gene expression profile in human and its potential clinical applications. *J Mol Med.* **82**, 317-324

Ward W.S., Coffey D.S., 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* **44**, 569-574

Ward W.S., Kimura Y., Yanagimachi R., 1999. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Bio Reprod.* **60**, 702-706

Ward F., Rizos D., Corridan D., Quinn K., Boland M., Lonergan P., 2001. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev.* **60**; 47-55

Wykes S.M., Visscher D. W., Krawetz S.A., 1997. Haploid transcripts persist in mature spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* **3**; 15-19.

Wykes S.M., Krawetz S.A., 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J Bio Chemistry* **278**, 29471-29477

Zalenskaya I.A., Bradbury E.M., Zalensky A.O., 2000. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Research Comm.* **279**, 213-218

Zamore P.D., 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Sci.* **296**, 1265-1269

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit auf äußerst freundlichen Wegen geleistete Unterstützung und Motivation zum Anfertigen dieser Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die kritische Durchsicht meiner Schriftstücke.

Ich danke meinem Betreuer Dr. Marc Boelhauve für die umfassende Unterstützung, und jederzeit geleistete Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen während meiner Doktorarbeit.

Die Firma Minitüb und insbesondere Dr. Simmet danke ich für die Bezahlung meiner Stelle und die jederzeit gewährten Hilfe.

Außerdem danke ich Dr. Stefan Bauersachs, Dr. Ottheinz Krebs, Dr. Helmut Blum und den anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Genzentrum) für die zahlreiche Diskussionen und Anregungen zu den RNA-Isolationsmethoden.

Dr. Barbara Kessler, Sonja Ewerling und Tuna Güngör vom Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Moor- und Versuchsgut Oberschleißheim) danke ich für die zahlreiche Bereitstellung der Spermienproben, die ich auch außerhalb der normalen Absamungstermine erhalten konnte.

Ich danke meinem Mann Serge Savchuk und meinen Eltern für die stets aufbauenden und unterstützenden Hilfestellungen, die zum Anfertigen dieser Arbeit wichtig und auch nötig waren.

10. Lebenslauf

Name: Savchuk (geb. Sosnina)
Vorname: Lika
Geburtsdatum: 9. Oktober 1973
Geburtsort: Dshambul (Kasachstan)
Familienstand: Verheiratet

Schulbildung

1980-1983 Grundschole in Dsambul/Kasachstan und Kuba
1983-1990 Oberschole in St-Petersburg (Leningrad)/ Russland

Berufsausbildung

1994-1997 Berufsfachschule für Krankenpflege der Schwesternschaft
München vom Bayerischen Roten Kreuz

Studium

1990-1992 Hochschule für Veterinärmedizin (4 Semester) in St.
Petersburg (Leningrad)/ Russland
1998-2004 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Promotion

2004-2006 Anfertigung der Dissertation im Fach Tiermedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München am Lehrstuhl für
molekulare Tierzucht und Biotechnologie.